

**AUS DER ABTEILUNG FÜR KLINISCHE CHEMIE
UND MOLEKULARE DIAGNOSTIK**

Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

- Geschäftsführender Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Harald Renz -

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Evaluierung von Troponin I- , CK-MB- und Myoglobinassay am DPC
IMMULITE 2500 Immunoanalyzer**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich der Humanmedizin der PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

Vorgelegt von

Iris Wehmer aus Melle

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am 27.05.2010
Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. H. G. Wahl

1. Koreferent: Prof. Dr. B. Noll

MEINER FAMILIE

1	Einleitung.....	1
1.1	Diagnostik von Herzinfarkt und akutem Koronarsyndrom.....	1
1.1.1	Überblick.....	1
1.1.2	kardiale Troponine als neuer Marker in der kardialen Diagnostik ...	4
1.2	Biochemische Aspekte von Troponin- , CK-MB und Myoglobin.....	9
1.3	Pathophysiologie der koronaren Herzkrankheit (KHK).....	15
1.3.1	Stabile AP (Belastungsangina)	15
1.3.2	Akutes Koronarsyndrom (ACS).....	17
1.3.2.1	Patienten mit instabiler AP und Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (IA/NSTEMI).....	17
1.3.2.2	Patienten mit akuten Myokardinfarkt (AMI) mit initialer ST-Streckenhebung im initialen EKG (STEMI).....	18
1.4	Labor und Methode.....	19
1.5	Fragestellung.....	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Probenmaterial	22
2.1.2	Materialaufbewahrung	22
2.1.3	IMMULITE 2500 (DPC Biermann)	22
2.1.3.1	Kalibratoren.....	22
2.1.3.2	Kontrollen	22
2.1.3.3	Verdünner	23
2.1.3.3.1	Troponin	23
2.1.3.3.2	CK-MB und Myoglobin	23
2.1.3.4	Sonstige Materialien.....	23
2.1.4	ADVIA Centaur (Bayer)	24
2.1.4.1	Kalibratoren.....	24
2.1.4.2	Kontrollen	24
2.1.4.3	Verdünner	25
2.1.4.3.1	Troponin	25
2.1.4.3.2	CK-MB und Myoglobin	25
2.1.4.4	Sonstige Materialien.....	25
2.1.5	IMMULITE Turbo (DPC Biermann)	26
2.1.5.1	Kalibratoren.....	26
2.1.5.2	Kontrollen	26
2.1.5.3	Verdünner	26

2.1.5.4	Sonstige Materialien.....	26
2.2	Methodik	27
2.2.1	Grundlegende Methodik	27
2.2.1.1	Methodik für den IMMULITE 2500 von DPC Biermann.....	27
2.2.1.1.1	Probenvorbereitung.....	27
2.2.1.1.2	Funktionsanleitung IMMULITE 2500	28
2.2.1.2	Methodik am ADVIA Centaur	33
2.2.1.2.1	Probenvorbereitung.....	33
2.2.1.2.2	Funktionsweise des ADVIA Centaur (Bayer).....	33
2.2.1.3	Methodik für den IMMULITE Turbo	39
2.2.1.3.1	Probenvorbereitung.....	39
2.2.1.3.2	Funktionsanleitung IMMULITE Turbo.....	39
2.2.2	Analytische Evaluierung	41
2.2.2.1	Inter- Assay (IMMULITE 2500).....	41
2.2.2.2	Intra- Assay (IMMULITE 2500).....	42
2.2.2.3	Linearität	43
2.2.2.4	Verschleppung	43
2.2.2.5	Methodenvergleich.....	44
2.2.2.6	Stabilität (nur für cTnl) oder Einfluß von Lagerungsdauer und - bedingungen.....	45
2.2.3	statistische Analyse	46
3	Ergebnisse zur analytischen Evaluierung.....	47
3.1	Kardiales Troponin- I-Studie	47
3.1.1	Inter-Assay- Präzision.....	47
3.1.2	Intra- Assay- Präzision.....	47
3.1.3	Linearität.....	48
3.1.4	Verschleppung.....	49
3.1.5	Methodenvergleich	50
3.1.6	Stabilität.....	54
3.2	Myoglobin-Studie	57
3.2.1	Inter- Assay- Präzision.....	57
3.2.2	Intra- Assay- Präzision.....	57
3.2.3	Linearität.....	58
3.2.4	Verschleppung.....	59
3.2.5	Methodenvergleich	60
3.3	CK- MB-Studie	62

3.3.1	Inter- Assay- Präzision.....	62
3.3.2	Intra- Assay- Präzision.....	62
3.3.3	Linearität.....	63
3.3.4	Verschleppung.....	64
3.3.5	Methodenvergleich	65
4	Diskussion	68
4.1	kardiale Marker in der Diagnostik akuter Koronarsyndrome	68
4.2	kardiale Marker bei der Verlaufskontrolle (z.B. nach Lyse, Stenting, Bypass, Transplantation) und der Diagnostik für Myokardschädigung.	69
4.2.1	Lyse, PTCA mit und ohne Stent.....	69
4.2.2	Herzoperationen	70
4.2.3	Herztransplantation.....	71
4.2.4	Kardiomyopathien.....	72
4.2.5	kardiotoxische Wirkung von Chemotherapeutika bei Patienten mit hämatotoonkologischer Grunderkrankung.....	72
4.2.6	Weitere Erkrankungen	73
4.3	Analytische Probleme.....	74
4.4	Methodenevaluierung am IMMULITE 2500.....	77
4.4.1	kardiales Troponin I	77
4.4.1.1	Inter- Assay- Präzision	77
4.4.1.2	Intra- Assay- Präzision	77
4.4.1.3	Linearität	77
4.4.1.4	Verschleppung	77
4.4.1.5	Methodenvergleich.....	78
4.4.1.6	Stabilität	78
4.4.2	Myoglobin	78
4.4.2.1	Inter- Assay- Präzision	78
4.4.2.2	Intra- Assay- Präzision	78
4.4.2.3	Linearität	79
4.4.2.4	Verschleppung	79
4.4.2.5	Methodenvergleich.....	79
4.4.3	CK-MB	80
4.4.3.1	Inter- Assay- Präzision	80
4.4.3.2	Intra- Assay- Präzision	80
4.4.3.3	Linearität	80
4.4.3.4	Verschleppung	80

4.4.3.5	Methodenvergleich	81
5	Zusammenfassung.....	82
6	Abstract.....	86
7	Tabellenverzeichnis	87
8	Abbildungsverzeichnis	88
9	Abkürzungsverzeichnis	90
10	Literaturverzeichnis	93

1 Einleitung

1.1 Diagnostik von Herzinfarkt und Akutem Koronarsyndrom

1.1.1 Überblick

In Deutschland und anderen westlichen Industrieländern stehen kardiovaskuläre Erkrankungen an erster Stelle der Todesursachen. In einer Rangliste des Statistischen Bundesamtes Deutschland von 2003 machen Erkrankungen des Herzens mit Todesfolge 23% aus (für beide Geschlechter). Dabei ist die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 9,8% (80.998 Todesfälle) auf Platz 1, gefolgt von dem Akuten Myokardinfarkt 7,4% (61.056) und der Herzinsuffizienz 5,8% (47.939). In Deutschland sterben also über 140.000 Menschen an der chronisch ischämischen Herzkrankheit oder an einem akuten Myokardinfarkt⁴².

Die akut lebensbedrohlichen Zustände wie instabile Angina (Klassifikation nach Braunwald, 1989), akuter Myokardinfarkt und plötzlicher Herztod werden alle mit dem Begriff Akutes Koronarsyndrom (ACS: engl. acute coronary syndrome) bezeichnet^{35, 76}

Das ACS beschreibt hiermit eine Konstellation von Symptomen, die mit einer akuten myokardialen Ischämie kompatibel sind. Dadurch, dass die Übergänge dieser klinischen Formen fließend sind, ist man dazu übergegangen mit Hilfe des EKGs, die Patienten mit (STEMI) und ohne ST-Streckenhebung (NSTEMI/instabile Angina) zu unterscheiden. Diese Einteilung ist auch für das weitere therapeutische Verfahren von Bedeutung.⁷⁵

Die Patienten mit einem ACS kommen mit einem akuten thorakalen Schmerz, der aber auch andere Ursachen haben kann z.B.: pulmonale-, muskuloskelettale-, gastrointestinale-, kardiovaskuläre Erkrankung oder andere Krankheitsbilder. Verdächtig für ein ACS sind Ruhebeschwerden mit einer Dauer von mehr als 20 Minuten. Durch Gabe von antiischämischen Medikamenten können sich die Beschwerden verbessern. Zur schnellen Absicherung der Diagnose und gleichzeitiger Risikostratifizierung werden ein Elektrokardiogramm (EKG), Blutentnahme zur Bestimmung biochemischer Marker (Troponin, Myoglobin und CK-MB), Echokardiographie und die

Koronarangiographie, die als Goldstandard gilt, durchgeführt.⁷⁵ Stellt sich im EKG heraus, dass es keine Auffälligkeiten gibt, heißt dies aber nicht notwendigerweise, dass kein ACS vorliegt. In diesem Fall liegt dann eine besondere Bedeutung bei den biochemischen Markern. Unter diesen Gesichtspunkten haben Braunwald und Hamm die Klassifikation der instabilen Angina pectoris um den Schweregrad III B Troponin pos./Troponin neg. erweitert⁷⁵. Diese Patienten haben per definitionem keinen Herzinfarkt nach WHO-Kriterien, aber wenn sie ein erhöhtes Troponin aufweisen, ist diese Unterscheidung wichtig, da die langfristige Prognose deutlich schlechter ist als bei Patienten ohne Troponinerhöhung. Diese Patienten erhalten die Diagnose „minor myocardial damage“ (MMD)⁷⁶.

Die Kreatinkinase CK und sein Isoenzym CK- MB zeigen eine Zellnekrose an^{81, 150}. Weitaus spezifischer und sensitiver sind Troponin I (cTnI) und Troponin T (cTnT)^{71, 96}. Die Redefinition des Myokardinfarkt (MI) durch die European Society of Cardiology (ESC) und das American College of Cardiology (ACC) im Jahr 2000 hat genau diesen Parameter - Troponin - zur Grundlage³. Da Troponin nicht sofort ansteigt, sondern erst nach 3-4 Stunden, ist es nicht zwingend notwendig diesen Wert schon im Notarztwagen^{81, 151}, sondern erst in der Notaufnahme und ein zweiter Wert 6-12 Stunden nach der Aufnahme⁷⁷ zu bestimmen.

Nach einem Infarkt können die Troponinwerte bis zu 3 Wochen erhöht sein¹⁰⁵, aus diesem Grund kann ein Reinfarkt durch Troponin nicht bzw. nur schlecht erkannt werden, hier verwendet man CK-MB und Myoglobin. Diese Parameter haben eine andere Kinetik⁷⁵.

Entwicklung der kardialen Marker

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO)⁴ definierte 1979 den Herzinfarkt als eine Kombination von zwei von drei Charakteristika, die wie folgt lauten:

- typische Symptome (Brustschmerz, etc.)
- Enzymerhöhung
- EKG-Veränderung⁴

In dieser Definition erhielten Biomarker das erste Mal eine wichtige Position zur Diagnosefindung. Dieser Marker sollte folgende Eigenschaften haben, um Schäden des Myokards zu erkennen¹³⁵:

1. Eine möglichst hohe Organspezifität, das heißt, dass die Konzentration dieses Markers im Herzen hoch sein und möglichst nicht in anderen Geweben vorkommen sollte.
2. Nach einem kardialen Ereignis sollte es zu einer schnellen Freisetzung kommen, um eine hohe Sensitivität innerhalb der ersten Stunden zu haben.
3. Der Biomarker sollte auch einige Tage nach dem kardialen Ereignis einen erhöhten Blutwert anzeigen, um so Läsionen nachweisen zu können, die schon ein paar Tage zuvor aufgetreten sind.
4. Die Bestimmung des Markers sollte gut und schnell sein¹³⁵.

Der erste Marker, der zum Einsatz kam, war die nicht kardiospezifische Glutaminaminotransferase/ Aspartataminotransferase (GOT/AST)¹¹³. 1960 wurde die Kreatinkinase (CK) als möglicher Marker gesehen, aber auch dieser war nicht herzspezifisch^{55, 59}. Die Isoenzyme der CK, die CK-MB- Aktivität, und der Lactatdehydrogenase¹⁷⁹ (LDH) wurden in den 70er als denkbare Marker vorgestellt. Nun begann die Entwicklung monoklonaler Antikörper zur Diagnose und Therapie menschlicher Erkrankungen (1980)^{15, 109}. Die CK-MB, ein Isoenzym der Kreatininkinase, hatte zwar bis dahin die höchste Myokardspezifität, konnte aber auch bei Skelettmuskelschädigungen, Traumata oder nach Operationen erhöht sein¹³⁴.

Diese Unspezifität gilt auch für das Myoglobin, welches ubiquitär im Muskelgewebe vorhanden ist, und bei Muskelerkrankungen und häufig auch bei Nierenerkrankungen erhöht ist¹⁷⁰. Ein Vorteil des Myoglobins ist aber, dass es als Frühmarker für die Diagnostik eines MI eingesetzt werden kann, wenn auch die klinischen Symptome daraufhinweisen, da es rasch aus dem geschädigten Muskelgewebe freigesetzt wird^{39, 130}.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keiner der genannten Biomarker die WHO-Anforderungen an einen Marker zu Erkennung herzmuskelspezifische Läsionen komplett erfüllt.

1.1.2 Kardiale Troponine als neuer Marker in der kardialen Diagnostik

Ein Marker, der alle Anforderungen der WHO erfüllt ist das kardiale Troponin (cTnI oder cTnT). Seine Kinetik sieht so aus, dass es 4 bis 6 Stunden nach dem kardialen Ereignis freigesetzt wird, nach ca. 18 Stunden das Maximum erreicht und für 6 bis 8 Tage im Blut nachweisbar ist⁴⁹. Dieser Parameter hat damit das größte diagnostische Fenster, aber eignet sich nicht zur Erkennung eines Reinfarktes.

Im Jahr 1987 ist von Cummins et al. ein Radio-Immunoassay entwickelt worden, mit dem man cTnI nachweisen konnte⁴⁹. Im Laufe der Entwicklung konnten monoklonale Antikörper gegen cTnI und cTnT hergestellt werden, die Troponin als herzspezifischen Biomarker für kardiale Ereignisse in die Diagnosefindung etablierten^{33, 104}.

Die stetige Weiterentwicklung der Troponin-Immunoassays und die sehr hohe Herzspezifität^{11, 12, 66, 132} führte dazu, dass die Troponine heute zur Diagnosefindung des MI und zur Risikostratifizierung von Patienten mit ACS einen großen Beitrag leisten^{3, 21, 78, 120, 132, 142, 143, 181}. Das Troponin kann erhöht sein, auch wenn die Symptome atypisch sind oder ganz fehlen und/ oder kein EKG vorhanden ist oder das EKG keinen Hinweis für einen MI zeigt¹¹⁸.

Aus diesem Grund hat die European Society of Cardiology und das American College of Cardiology ein Konsensusprotokoll zur Allgemeinen Definition des MI vorgelegt¹⁶⁵.

Allgemeine Definition des Myokardinfarktes durch das ESC/ACC Komitee 2007:Kriterien für einen akuten Myokardinfarkt

Der Ausdruck Myokardinfarkt sollte verwendet werden, wenn es einen Anhalt für eine Myokardnekrose passend zur klinischen Situation gibt. Unter dieser Bedingung entspricht jede der folgenden Kriterien einer Diagnose für Myokardinfarkt:

- Feststellung eines Anstiegs kardialer Biomarker (vorzugsweise Troponin) mit mindestens einem Wert über der 99sten Perzentile des oberen Referenzbereiches im Zusammenhang mit wenigstens einem der folgenden Punkte für Myokardischämie:
 - Ischämiesymptome
 - Entwicklung einer pathologischen Q-Welle im EKG
 - EKG zeigt Hinweise für eine Ischämie (ST-Strecken-Veränderung oder einen neu aufgetretenen Linksschenkelblock)
 - Koronararterienintervention (z.B. Koronarangioplastie)
 - Bildgebende Anhalte für einen Verlust von Myokard oder einen neuen Bereich mit Wandbewegungsstörung
- Plötzlicher, unerwarteter Herztod häufig mit Symptomen, die auf eine Myokardischämie hindeuten und voraussichtlich mit ST-Streckenhebung, einem neuen Linksschenkelblock und/ oder einem Nachweis eines frischen Thrombus in der Koronarangiographie und/ oder Autopsie begleitet werden. Der Tod tritt ein, bevor eine Blutprobe genommen werden kann oder vor dem Auftreten von kardialen Markern im Blut.
- Bei der perkutanen Koronarintervention (PCI) von Patienten mit normalen Troponinwerten, ist ein Anstieg von Troponin über die 99. Perzentile des oberen Referenzbereiches ein Hinweis für Myokardnekrose während des Eingriffes. Nach der Vereinbarung ist der Anstieg von Biomarkern auf mehr als die dreifache 99. Perzentile des oberen Referenzbereiches ein durch die PCI verursachter

Myokardinfarkt. Ein Subtyp bezogen auf eine dokumentierte Stentthrombose ist anerkannt.

- Bei der ACVB- Operation von Patienten mit normalen Troponinwerten, ist ein Anstieg von Troponin über die 99. Perzentile des oberen Referenzbereiches ein Hinweis für eine Myokardnekrose während des Eingriffes. Nach der Vereinbarung ist der Anstieg von Biomarkern auf mehr als die fünffache 99. Perzentile des oberen Referenzbereiches plus die Entwicklung einer pathologischen Q-Welle im EKG, ein neuer Linksschenkelblock, ein durch eine Angiographie bestätigter Verschluss eines Bypasses oder einer Koronararterie oder bildgebende Verfahren, die einen Verlust von Myokard oder einen neuen Bereich mit Wandbewegungsstörung anzeigen, ein durch die ACVB- OP verursachter Myokardinfarkt.
- Pathologische Zeichen für einen akuten Myokardinfarkt.

Kriterien für einen gesichert abgelaufenen Myokardinfarkt

Eine der folgenden Kriterien sichert die Diagnose eines abgelaufenen MI:

- Entwicklung einer neu auftretenden Q-Welle im Langzeit-EKG.
- bildgebende Verfahren, die einen Verlust gesunden Myokards zeigen, in Abwesenheit nichtischämischer Gründe
- Pathologische Zeichen für die Heilung oder den abheilenden MI.

In der Redefinition des Myokardinfarkts durch die ESC und ACC von 2000 wurde der Troponinanstieg als Hauptkriterium für die Diagnose festgelegt. Dies hat im Vergleich zu der früheren MI- Definition der World Health Organisation (WHO) aus den 80er Jahren⁴ zu einer bedeutsamen Zunahme der Myokardinfarktdiagnosen geführt, mit entsprechend höherer Belastung der Intensivstationen und Katheterlabore^{18, 149}.

Ein weiterer Anstieg der Myokardinfarktdiagnosen wurde durch die Festlegung des einheitlichen Grenzwertes für die Biomarker als 99. Perzentile erzielt^{19, 165}.

Aufgrund der hohen Anzahl vieler verschiedener Hersteller von cTnI mit Verwendung von Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope und unterschiedlicher Standards ist eine Vergleichbarkeit bisher schwierig¹³⁶. Trotzdem sollte ein möglichst niedriger Variationskoeffizient (CV) angestrebt werden. Der Variationskoeffizient sollte bei $\leq 10\%$ liegen¹⁴⁰. Dieses Problem gibt es bei cTnT nicht, da dies von nur einem Hersteller erhältlich ist¹³⁶. Die neue diagnostische Entscheidungsgrenze ist als das 99. Perzentil einer gesunden Referenzpopulation definiert, sofern bei diesem Wert im Rahmen der totalen Präzisionsbestimmung ein $CV < 10\%$ vorhanden ist¹⁷. Da es bisher jedoch keinen Hersteller gibt, der diesen Anforderungen gerecht wird, soll der Cut-Off Wert dort liegen, wo ein $CV = 10\%$ so nah wie möglich bei der 99. Perzentile besteht.

Weiterhin schlagen die ESC und die ACC vor, dass Patienten nach einem bestimmten Zeitplan Blut abgenommen wird. Bei der Aufnahme, 6-9 Stunden nach Auftritt der Symptome und dann nach 12-24 Stunden, falls sich in den vorherigen Proben keine Hinweise auf ein kardiales Geschehen gezeigt hat, aber die Symptome weiterhin daraufhin weisen. Stellt sich also ein Patient kurz nach dem Auftreten seiner Symptome in der Notaufnahme vor, sollen ihm sowohl kardiale Troponine als auch CK-MB und Myoglobin abgenommen werden, da diese schon früher, aber weniger spezifisch, die Diagnose eines akuten Myokardinfarkts zulassen¹⁸⁴. Die Messung von kardialem Troponin gilt also in der heutigen Zeit als biochemischer Standard, um einen Herzinfarkt zu diagnostizieren³. Eine zweimalige Messung ist notwendig, wenn die erste Messung von Troponin negativ war und die Beschwerden anhalten, da sich nach 6 Stunden ein Troponinanstieg zeigen kann, und auf diese Weise ein MMD („minor myocardial damage“) diagnostiziert werden kann⁷⁶. Die Erhöhung von Troponin zeigt eine Verletzung des Myokards an, aber nicht deren Ursache. Wenn also keine klinischen Zeichen für eine Ischämie vorhanden sind, muss nach einer anderen Ursache geforscht werden³.

Andere Ursachen für eine Troponinerhöhung^{26, 67}

- a) Trauma (z.B. Quetschung, Ablation, pacing, ICD- Aktion, Kardioversion, Endomyokardbiopsie, Herz-OPs)
- b) Akute und chronische angeborene Herzfehler
- c) Aortenklappenfehler und Hypertrophische Obstruktive Kardiomyopathie mit signifikanter linksventrikulärer Hypertrophie
- d) Bluthochdruck
- e) Niedriger Blutdruck oft mit Arrhythmien
- f) Nichtkardiale OPs ohne Komplikationen
- g) Nierenerkrankungen
- h) Schweres Asthma
- i) Kritische Krankheiten: Diabetes mellitus, respiratorisches Versagen, Hämolytisches Urämisches Syndrom
- j) Medikamentenintoxikation (z.B. Adriamycin, 5-Fluorouracil, Herceptin, Schlangengift)
- k) Hypothyreose
- l) Herzgefäßspasmus
- m) Infektionskrankheiten (z.B. Myokarditis, Parvovirus B 19- Infektion, Kawasaki- Syndrom, myokardiale Ausbreitung einer bakteriellen Endokarditis)
- n) PCI ohne Komplikationen
- o) Lungenembolie, schwere pulmonale Hypertension
- p) Sepsis
- q) Verbrennung, besonders, wenn > 30% der oberflächlichen Haut betroffen ist
- r) Speicherkrankheiten, einschließlich Amyloidose, Hämochromatose, Sarkoidose und Sklerodermie
- s) Akute neurologische Erkrankungen: subarachnoidale Blutung
- t) Rhabdomyolyse mit Herzverletzung
- u) Transplantatbedingte Vaskulopathie
- v) Vitale Erschöpfung

1.2 Biochemische Aspekte von Troponin- , CK-MB und Myoglobin

Der Herzmuskel, welcher quergestreift ist, ist aus folgenden Bestandteilen aufgebaut:

Aktin und Myosin= herzspezifische kontraktile Proteine

Myoglobin= Sauerstoffträger im Muskel

Kreatinkinase (bes. Isoform **CK-MB**) katalysiert den Transfer von energiereichem Phosphat zwischen ATP, Kreatin und Laktatdehydrogenase

Troponin und Tropomyosin= regulierende Proteine

Dadurch, dass alle drei Parameter eine unterschiedliche Freisetzungzeit, Clearance und Gewebeverteilung haben, können sie verschiedenen Diagnosen zugeordnet werden oder einer Diagnose, wobei sie zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt auftreten¹²⁶.

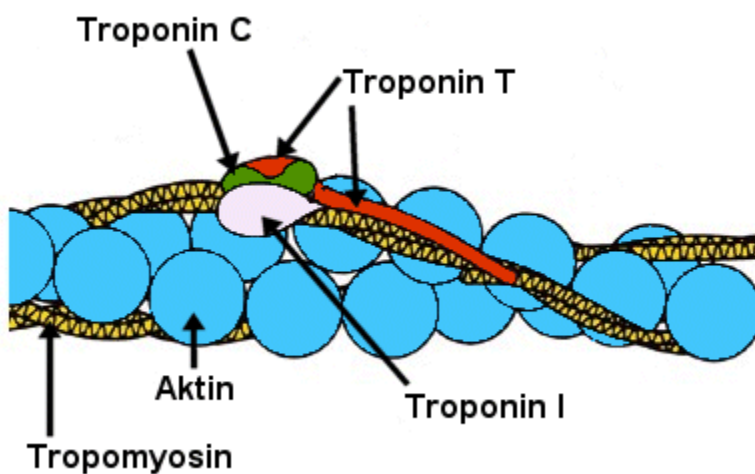
Troponin

Das relative Molekulargewicht von Troponin beträgt ~80.000 Da. Das Troponin ist zusammen mit Tropomyosin auf dem polymerisierten Aktinfilament lokalisiert, dieses bildet das Rückgrat des dünnen Filamentes^{57, 64}. Troponin reguliert die Kontraktion der gestreiften Muskulatur¹⁶¹, indem es als Sensor für die intrazelluläre Calciumkonzentration dient. Wird der Muskel stimuliert, gelangt Ca^{2+} in die Muskelzelle. TnC bindet das Calcium und hebt die Hemmung durch das TnI auf. Der Muskel kann sich nun kontrahieren^{64, 73, 157}. Bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration interagiert cTnI mit Aktin und inhibiert so die Aktomyosin-ATPase^{63, 160, 162}.

Das Troponin besteht aus drei Troponinuntereinheiten^{58, 64, 73, 84, 85, 91, 157}. Jede dieser Untereinheiten hat spezifische Isoformen, so dass im Herzmuskel eine andere Isoform zu finden ist als im Skelettmuskel. Aus diesem Grund ist die Spezifität sehr hoch^{53, 54}.

- Troponin C → Bindungsstelle von Ca^{2+} , reguliert somit die Aktivität der Troponine T und I
- Troponin I → inhibitorische Funktion, verhindert die Bindung von Aktin und Myosin
- Troponin T → Aktin-Tropomyosin-Bindungskomponente

Abbildung 1: Troponin-Komplex aus Hirschl MM, Journal für Kardiologie 2006⁸⁸



Troponin T, mit einem Molekulargewicht von 30.500 Da^{83} , bindet an Tropomyosin. Durch diese Interaktion ist der Troponinkomplex mit dem dünnen Filament des Muskels verbunden. Für diese Untereinheit des Troponins gibt es zwei Isoformen, die jeweils für ihr Gewebe spezifisch sind. Das skelettale Troponin (sTnT) ist in der Skelettmuskulatur zu finden und die kardiale Form (cTnT) ist für den Herzmuskel spezifisch. In der Fetal- und Neonatalzeit ist diese Spezifität noch nicht ausgebildet und beide Formen werden sowohl im Skelettmuskel als auch im Herzmuskel gefunden. Das kardiale Troponin T hat wiederum vier verschiedene Isoformen, von denen aber nur eine Form beim Erwachsenen vorkommt^{20, 65}. Ab der embryonalen Phase wird das sTnT im Herzmuskel und das cTnT im Skelettmuskel immer mehr supprimiert, so dass mit Abschluss von neun Monaten sTnT nur noch im Skelettmuskel und cTnT nur noch im Herzmuskel exprimiert wird^{20, 148, 167}.

Das **Troponin I** ist ein Regulatorprotein, indem es die Interaktion von Myosin und Aktin reguliert^{83, 119}. Troponin I, sein Molekulargewicht beträgt 24.000 Da, interagiert dabei mit Aktin und blockiert die Myosinbindungsstelle⁸³. Es existieren drei Isoformen, jede wird von einem Gen kodiert⁴⁰. Im Skelettmuskel gibt es das schnelle (fTnI) und das langsame (sTnI) und im Herzmuskel das kardiale Troponin (cTnI)^{80, 176}. Durch zwei signifikante Unterschiede ist Troponin I ein absolut herzspezifisches Protein.

1. Aminosäurefrequenzunterschied zwischen den drei Isoformen beträgt ~ 40%¹⁰⁰
2. An dem N-terminalen Ende von cTnI hängen noch 31 weitere Aminosäuren, welche bei den skelettalen Formen nicht zu finden sind^{131, 141, 146, 156, 171, 177}

Das Troponinmolekül hat 209 Aminosäuren, in Position 23 und 24 finden sich Serine, die in vivo durch Proteinkinase A und andere Proteine phosphoryliert werden können^{14, 101}. Es können so vier unterschiedliche Formen entstehen, die alle eine andere Konformation haben. Dies musste also auch Beachtung bei der Antikörperentwicklung für einen Assay finden⁵⁰.

Troponin C hat ein Molekulargewicht von 18.000 Da⁸³. Es geht mit Troponin I eine feste Beziehung ein, deren Stärke von der Ca^{2+} -Sättigung abhängt^{92, 117, 185}. Troponin ist ein Sensor für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, wenn durch eine Stimulation des Muskels Ca^{2+} in die Zelle einströmt, bindet Calcium an das N-terminale Ende von Troponin C. Es kommt nun zu einer Umwandlung des N-terminalen Endes von der geschlossenen in die offene Form^{86, 91, 158}. Diese erleichtert die Freigabe der regulatorischen Region des Troponin I des dünnen Filaments (Aktin) und sichert die Bindung von Troponin I an Troponin C. Die Myosinbindungsstelle ist frei, die Aktinmyosin- Mg^{2+} -ATPase ist nicht mehr gehemmt¹⁷² und es kann eine Kontraktion stattfinden.

Für Troponin C gibt es keine gewebsspezifischen Isoformen, so dass eine Erhöhung im Blut keine klare Aussage für eine Herzmuskelschädigung ist¹⁴⁷. Während der Entwicklung ist das TnC unverändert und auch bei Herzversagen bleibt es konstant¹³⁸.

Myoglobin

Myoglobin ist ein 17.800 Da¹¹⁶ schweres, sauerstoffbindendes Hämprotein, mit einer Polypeptidkette von 153 Aminosäuren (Globin) und einer Hämgruppe. Myoglobin beteiligt sich am Sauerstoffmetabolismus^{83, 178}, indem es Sauerstoff reversibel bindet. Dabei ist die Sauerstoffaffinität um das Sechsfache höher als bei Hämoglobin. Das Eisen bleibt bei der Sauerstoffbindung zweiwertig. Es ist im Zytoplasma von Skelett- und Herzmuskulatur lokalisiert und macht 2% der gesamten Muskelproteine aus¹⁷⁸. Aus diesem Grund zeigen sich sehr hohe Werte bei Muskeltraumen und es kann eine Aussage über die Infarktgröße gemacht werden¹⁸². Ein Anstieg ist bereits ein bis vier Stunden nach der kardialen Schädigung festzustellen^{133, 183}. Da es wegen seiner geringen molekularen Größe schnell über die Niere eliminiert wird und dadurch nur <24 Stunden im Blut nachweisbar ist, ist es kein geeigneter Marker, um einen länger zurückliegenden Infarkt festzustellen. Es eignet sich aber für die Reinfarkt Diagnostik, jedoch nur, wenn die Nierenfunktion nicht eingeschränkt ist^{8, 10, 144}. Ein erhöhter Serummyoglobinspiegel ist ein guter Indikator für eine erfolgreiche Reperfusionstherapie^{8, 10, 70, 121}. Weiterhin findet man erhöhte Myoglobinspiegel bei Patienten, die sehr krank sind^{16, 89} und bei verschiedenen Skelettmuskeltraumen¹¹⁶.

Kreatinkinase und Kreatinkinase MB

Kreatinkinase (Adenosin- 5` - triphosphat- Kreatinphosphotransferase) ist in fast allen Geweben zu finden, allerdings am meisten im Skelettmuskel, Myokard und dem Gehirn, aber auch im GIT, in der Lunge, im Uterus, im Urogenitalsystem und in der Schilddrüse in unterschiedlichen Isoenzymformen^{16, 83, 145, 169}. Ihre Halbwertszeit beträgt 16 Stunden. Hauptsächlich ist die CK im Zytoplasma lokalisiert, geringe Mengen sind an das sarkoplasmatische Retikulum, die Kernmembran und an die Myofibrillen gebunden⁸³. Die Aufgabe der CK besteht darin, den Transfer energiereichen Phosphats zwischen ATP und Kreatin zu katalysieren²⁸. Ein Anstieg nach einem Myokardinfarkt kann nach 4 bis 8 Stunden registriert werden, der Peak ist nach 24 Stunden erreicht und ein Level im Referenzbereich zeigt sich wieder nach 2 bis 3 Tagen¹⁰. Falsch- positive Werte können aber auch bei Muskelerkrankungen, Alkoholintoxikation, Diabetes mellitus, Skelettmuskeltraumen, Krampfanfällen, intramuskulären Injektionen, Lungenembolie, starke körperliche Anstrengung und Thoracic- outlet- Syndrom (= neurovaskuläre Kompressionssyndrom im Bereich der oberen Thoraxapertur) auftreten^{10, 11, 123}.

Die Isoenzyme der Kreatinkinase

Die CK hat zwei Untereinheiten M (muscle) und B (brain), welche ein Molekulargewicht von 39.000 bis 42.000 Da haben und von zwei unterschiedlichen Genen codiert werden^{28, 51, 62, 108}. Zunächst findet man in der Embryonalzeit hauptsächlich das CK-B, mit dem Heranwachsen nimmt sie immer mehr ab und die Expression von CK-M nimmt zu. In der Skelett- und Herzmuskulatur kann man also während der Entwicklung alle drei Isoenzyme finden, da die CK-MM- Form aus der CK-BB- Form über die CK- MB- Form entsteht⁶¹. Es gibt also drei Isoenzyme, die als Dimer und beim Erwachsenen in folgender Gewebeverteilung vorkommen:

CK-MM: reife Skelettmuskulatur und Herzmuskel

CK-MB: Herzmuskulatur

CK-BB: Gehirn und Nervengewebe^{145, 168, 169}

Die Verteilung zeigt also auch eine bestimmte Menge von CK-MB in der Skelettmuskulatur, diese macht etwa 1 bis 3 % aus¹⁶⁹. Die drei Isoenzyme haben unterschiedliche Halbwertszeiten:

CK-MM: 17 Stunden

CK-MB: 12 Stunden

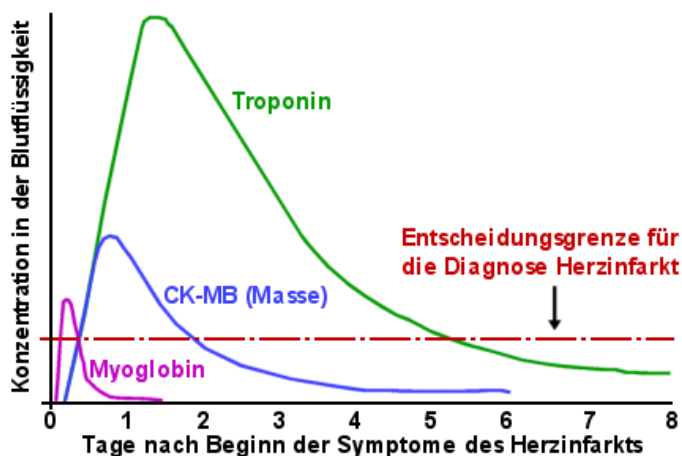
CK-BB: 3 Stunden⁸³

CK-MB ist also nicht so herzspezifisch wie Troponin I oder T. Erhöhte Werte findet man nach einem AMI, bei Patienten mit Hypertension, Linksherzhypertrophie und KHK⁹³, desweiteren auch bei Marathonläufern nach 24 Stunden, bei Hochleistungssportlern, nach einer Muskelverletzung^{95, 153} und bei chronischen Myopathien^{97, 107, 154}.

1.3 Pathophysiologie der koronaren Herzkrankheit (KHK)

Die wichtigste Ursache der koronaren Herzkrankheit ist die Koronarsklerose, die zu einer Einengung oder auch zu einem kompletten Verschluss der Arterie führen kann, die Folge ist eine Ischämie. Es kann zu unterschiedlicher Ausprägung kommen, von asymptomatisch über Angina pectoris (AP) bis hin zum Myokardinfarkt. Bei der AP liegt ein Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot vor. Der Patient nimmt diese als charakteristische Thoraxschmerzen wahr¹⁶⁴. Die Folgen einer Ischämie sind von der Schwere und der Zeitspanne der Okklusion abhängig. Eine vorübergehende Mangel durchblutung führt zu einer Einschränkung der biomechanischen und elektrischen Funktion des Herzens. Bei einem akuten Verschluss, der aber zeitlich begrenzt ist, wird die Muskelfunktion beeinträchtigt. Besteht dieser Verschluss länger kommt es zum Absterben der Myozyten und zur Nekrose⁷⁹.

Abbildung 2: Kurvenverlauf der Freisetzung der kardialen Biomarker⁷



1.3.1 Stabile AP (Belastungsangina)

Die Angina pectoris ist ein Unwohlsein im Thoraxbereich, welches durch psychische oder physische Belastung hervorgerufen wird. Durch Ruhe oder sublinguale Gabe von Nitrat kommt es innerhalb von fünf bis zehn Minuten zur Besserung der Beschwerden. Es tritt keine Nekrose auf^{38, 79}.

Ursachen für einen vermehrten Sauerstoffbedarf, die zu einer AP führen, bei gleichzeitigem Vorliegen einer KHK^{34, 99}:

1. Gefühlsregung
2. Mentaler Stress
3. Hast
4. Ärger
5. Körperliche Anstrengung nach dem Essen
6. Metabolische Ursachen: Erkältung, Fieber, thyreotoxische Krise, Blutdruckkrisen, Tachykardie und Hypoglykämie

Ursachen für ein erniedrigtes Sauerstoffangebot:

1. Vasokonstriktion der Koronararterien^{68, 87} oder Verlust der Vasodilatation⁷⁹
2. Anämien, Kohlenmonoxidvergiftung im Zusammenhang mit einer KHK¹⁶⁴

1.3.2 Akutes Koronarsyndrom (ACS)

1.3.2.1 Patienten mit instabiler AP und Nicht- ST- Streckenhebungsinfarkt (IA/NSTEMI)

Die instabile Angina pectoris ist durch eines der folgenden Charakteristika definiert:

- die AP tritt in Ruhe oder nur bei minimaler Anstrengung auf
- neu aufgetretene AP
- zunehmende AP- Beschwerden (länger, häufiger, schwerer)

Die Diagnose eines NSTEMI ist gesichert, wenn zusätzlich zu den Beschwerden einer instabilen AP noch kardiale Biomarker nachzuweisen sind, die auf eine Myokardnekrose hinweisen³⁶.

Tabelle 1: Klassifikation der instabilen Angina pectoris nach Braunwald^{35, 36}

	SCHWEREGRAD
Klasse I	Neu aufgetretene, schwere oder zunehmende Angina pectoris Patienten mit AP seit weniger als zwei Monaten, schwere oder häufige Symptomatik (drei Episoden oder mehr pro Tag) oder Patienten mit deutlicher Zunahme der AP-Symptome und Auslösung dieser Beschwerden durch sehr geringe Belastung; keine Ruhebeschwerden in den letzten zwei Monaten
Klasse II	Subakute Ruhe-Angina pectoris Patienten mit einer oder mehreren Episoden von Ruhe-AP im letzten Monat, aber nicht in den letzten 48 Stunden
Klasse III	Akute Ruhe-Angina pectoris Patienten mit einer oder mehreren Episoden von Ruhe-AP innerhalb der letzten 48 Stunden
	KLINISCHE UMSTÄNDE
Klasse A	Sekundäre instabile Angina pectoris Patienten mit einer klar definierten extrakardialen Ursache der Verstärkung ihrer kardialen Ischämie, z. B. Anämie, Infektion, Fieber, Hypotonie, Tachyarrhythmie, Thyreotoxikose, Hypoxie bei Ateminsuffizienz
Klasse B	Primäre instabile Angina pectoris
Klasse C	Postinfarktelle instabile Angina pectoris Patienten mit instabiler AP innerhalb von zwei Wochen nach einem dokumentierten Myokardinfarkt
	INTENSITÄT DER THERAPIE (unter der die instabile AP auftritt)
Grad 1	Keine oder minimale Therapie
Grad 2	Auftreten der Symptome unter Standardtherapie der stabilen AP (konventionelle Dosis oraler β -Blocker, Nitrate, Calciumantagonisten)
Grad 3	Auftreten der Symptome trotz maximaler oraler Therapie mit allen drei Standardsubstanzen (siehe Grad 2), einschließlich intravenöser Nitratherapie

Die Klasse IIIB wird in Troponin-positiv/-negativ unterteilt.

Die Entwicklung einer instabilen AP kann durch folgende Ursachen erklärt werden, wobei auch mehrere Faktoren gleichzeitig dazu beitragen können:

- Plaqueruptur oder Erosion mit zusätzlichem, nicht verschließendem Thrombus
- dynamische Verengung (z. B. Prinzmetal- Angina)
- fortschreitende mechanische Verengung (z. B. Koronarsklerose, Restenose nach perkutaner koronarer Intervention)
- sekundäre instabile AP (vermehrter Sauerstoffverbrauch und/oder verminderter Versorgung (Anämie))⁷⁹

1.3.2.2 Patienten mit akuten Myokardinfarkt (AMI) mit initialer ST-Streckenhebung im initialen EKG (STEMI)

Zu einem STEMI kommt es nach einer plötzlichen Okklusion durch einen Thrombus in einem schon durch Atherosklerose eingeengten Herzkranzgefäß. Ein Infarkt tritt meistens an Stellen auf, an denen atherosklerotische Plaques einreißen, platzen oder rupturieren. Die Thrombogenese läuft ab und es entsteht ein Thrombus, der das Gefäßlumen einengt. Kommt es jedoch zu einem chronischen Fortschreiten der Atherosklerose können sich auch Kollateralkreisläufe ausbilden, die Versorgung des Gewebes hinter der Stenose sichern. Es gibt auch noch andere Ursachen, die zu einem AMI führen können. Diese sind aber viel seltener.

1. Koronararterienembolie
2. angeborene Fehlbildungen
3. Koronararterienspasmus
4. Systemerkrankungen (insbesondere entzündliche Systemerkrankungen)

Der Umfang der Herzmuskelzerstörung ist von mehreren Faktoren abhängig:

1. Versorgungsgebiet der Koronararterie
2. Grad des Verschlusses
3. Dauer des Verschlusses
4. Ausbildungsgrad eines Kollateralkreislaufs
5. Sauerstoffbedarf des betroffenen Myokardgewebes
6. individuelle Faktoren, die zu einer spontanen Lyse beitragen
7. Angemessenheit der Durchblutung nach der Reperfusionstherapie⁷⁹

1.4 Labor und Methode

Die Methode des IMMULITE 2500 ist ein Chemilumineszenz- Assay, der an diesem neuentwickelten Gerät innerhalb von 15 Minuten zu einem Ergebnis führt. Dieser kurze Zeitraum ist besonders unter dem Aspekt des POC (Point of care) in der klinischen Anwendung als positiv zu bewerten. Es kann somit in einem kürzeren Zeitraum zu einer therapeutischen Intervention kommen.

Für die Praxis wurden mittlerweile mehrere Schnelltest eingeführt. Von *Roche* gibt es den Trop- T- sensitiven Schnelltest (TROPT). Dies ist ein qualitativer Nachweis von Troponin in antikoaguliertem (EDTA oder Heparin) venösem Vollblut. Die Reaktionsdauer beträgt 15 Minuten und der Cut- off- Wert liegt bei 0,1 ng/ml, so dass auch in der Praxis bereits unter dem Aspekt des Point of care schnell gehandelt werden kann.

Der Test enthält zwei für kardiales Troponin T spezifische monoklonale Antikörper, von denen einer goldmarkiert und der andere biotinyliert ist. Die beiden Antikörper bilden mit dem Troponin T einen Sandwichkomplex. Nach Abtrennung der Erythrozyten durchfließt das Plasma die Nachweiszone, auf der durch Anlagerung der goldmarkierten Troponin-T-Sandwich-Komplexe das positive Signal als rötlicher Strich sichtbar wird. Die überschüssigen goldmarkierten Antikörper binden an dem Kontrollstrich. Das Erscheinen des Kontrollstrichs zeigt die ordnungsgemäße Funktion des Tests an.

Ein Schnelltest für Troponin I wurde von *BioNexia®* entwickelt. Es ist ein einstufiger MembranImmunoassay für den schnellen, qualitativen Nachweis von menschlichem Herztroponin I aus Vollblut, Serum oder Plasma und ist ein Hilfsmittel in der Diagnose eines Myokardinfarkts (MI).

Durch eine Kombination von Partikel-konjugierten cTnI-spezifischen Antikörpern und Fängerreagenzien kann selektiv cTnI in Vollblut, Serum der Plasma nachgewiesen werden kann. Die Nachweisgrenze (Cut off) liegt bei diesem Test bei 1 ng/ml.

Ein weiterer Test ist der *HerzSTATus®*-Test von Spectral Diagnostics Inc.

Ein Anstieg der Intervention ist durch die Neudefinition des MI durch die ESC und ACC von 2000 gegenüber der MI- Definition der WHO aufgetreten. Es wurde zum einen der Serumanstieg von kardialen Troponin als Hauptkriterium für die Diagnose des Myokardinfarktes festgelegt⁴³ und als einheitlicher Grenzwert für die Biomarker die 99. Perzentile einer gesunden Population festgelegt^{19,165}. Sofern bei diesem Wert im Rahmen der totalen Präzisionsbestimmung ein $CV < 10\%$ vorhanden ist¹⁷. Da es bisher jedoch keinen Hersteller gibt, der diesen Anforderungen gerecht wird, soll der Cut-Off Wert dort liegen, wo ein $CV = 10\%$ so nah wie möglich bei der 99. Perzentile besteht^{17, 19, 24, 37, 60}.

1.5 Fragestellung

Die Dissertation behandelt die Evaluierung der Immunoassays Myoglobin, CK-MB und Troponin I am IMMULITE 2500. Durchgeführt in der Abteilung der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikum Marburg/ Gießen. Es wurden entsprechende Untersuchungsreihen wie Intra-assay- Studie, Inter- Assay- Studie, Verdünnungslinearität, Verschleppung und Methodenvergleich ggf. Stabilität durchgeführt, um die analytische Zuverlässigkeit der Tests und die Vergleichbarkeit mit anderen Methoden festzustellen. Der Methodenvergleich wurde am ADVIA Centaur der Firma Bayer und am IMMULITE turbo der Firma DPC Biermann durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial

Die Proben wurden im Rahmen der Qualitätssicherung aus dem Zentrallabor der Universitätsklinik Marburg nach erfolgter Routinemessung der Kardiomarker entnommen. Die Probe wurde analysiert und für die verschiedenen Untersuchungen anonymisiert eingesetzt.

2.1.2 Materialaufbewahrung

Die Probe wurde entweder sofort bearbeitet und anschließend archiviert oder ein Teil der Probe wurde in Plastikreagenzgläsern abpipettiert, mit einem vierstelligen Barcode versehen und in den Kühlschrank bei ca. 6°C, zur Verarbeitung am nächsten Tag, oder bei – 24°C eingefroren, um sie an einem bestimmten Tag zu messen. Die Erwärmung oder das Auftauen erfolgte bei Zimmertemperatur, als nächstes wurde die Probe gemischt, zentrifugiert und an den jeweiligen Geräten gemessen.

2.1.3 IMMULITE 2500 (DPC Biermann)

2.1.3.1 Kalibratoren

Zur Kalibration des Gerätes für die einzelnen Tests wurde lyophilisiertes Troponin I (bzw. Myoglobin oder CK-MB) in niedrig und hoch von der Firma DPC Biermann verwendet. Das Kalibrationsintervall war alle 2 Wochen oder wenn eine neues Kit mit einer neuen Charge eingesetzt wurde. Die Kalibratoren wurden wie Proben behandelt.

2.1.3.2 Kontrollen

Zur täglichen Qualitätskontrolle wurde das Kardiomarker-Kontrollmodul der Firma DPC Biermann verwendet. Dieses enthält mit akutem Myokardinfarkt

(AMI) assoziierte Marker (CK-MB, Homocystein, Myoglobin und Troponin I) in zwei Konzentrationen. Das Kontrollmaterial wurde genau wie das Patientenmaterial in die Racks eingesetzt und gemessen.

Tabelle 2: Qualitätskontrollwerte für TnI IMMULITE 2500 in ng/ml (L5KSTI)

Kontrolle	Mittelwert	3SD- Bereich
CCC10007	0,65	0,47-0,83
CCC20007	10,5	7,8-13,2

Tabelle 3: Qualitätskontrollwerte für CK-MB IMMULITE 2500 in ng/ml (L5KCP)

Kontrolle	Mittelwert	3SD-Bereich
CCC10007	6,00	4,65-7,35
CCC20007	89,00	71,6-106

Tabelle 4: Qualitätskontrollwerte für Myoglobin IMMULITE 2500 in ng/ml (L5KMY)

Kontrolle	Mittelwert	3SD-Bereich
CCC10007	95,0	73,7-116,3
CCC20007	258,0	198-318

2.1.3.3 Verdünner

2.1.3.3.1 Troponin

Multidiluent 1: normales Humanserum mit nicht-nachweisbarem Gehalt an Troponin I Kardiomarker- Kontrollmodul

2.1.3.3.2 CK-MB und Myoglobin

Multidiluent 2: nichthumane Protein/Puffer-Matrix

2.1.3.4 Sonstige Materialien

Ein Chemilumineszenz-Substratmodul, welches einen Phosphatester des Adamantyldioxetan beinhaltet.

Weiterhin ein Waschpuffer- und Reinigungsmodul und Reaktionsgefäße der Firma DPC- Biermann.

2.1.4 ADVIA Centaur (Bayer)

2.1.4.1 Kalibratoren

Das Gerät verwendet zur Kalibration zwei Kalibratoren niedrig und hoch aus Ziegen Serum von der Firma Bayer. Der ADVIA Centaur wird mit einer Basiskalibrationskurve jeweils vor Verwendung einer neuen Charge für Lite-Reagenz und Festphase kalibriert. Dafür werden die speziell zur Charge gehörenden Angaben der Basiskurvenkarte und ein Barcode mittels Barcodeleser oder Tastatur eingelesen. Die Berechnung der Probenkonzentration erfolgt automatisch durch das Messgerät.

2.1.4.2 Kontrollen

Mit dem Herzmarker 1,2,3 Qualitätskontrollmaterial wurde in der täglichen Routine die Qualitätskontrolle durchgeführt. Dabei wurde das Kontrollmaterial wie Patientenserum auf dem Gerät getestet.

Tabelle 5: Qualitätskontrollwerte für TnI Centaur in ng/ml

Kontrolle	Mittelwert	Range
1	0,64	0,37-0,91
2	16,9	13,7-20,1
3	40,5	31,0- 50,0

Tabelle 6: Qualitätskontrollwerte für CK-MB Centaur in ng/ml

Kontrolle	Mittelwert	Range
1	4,26	3,33-5,19
2	31,4	24,0-38,8
3	103	77,7- 128

Tabelle 7: Qualitätskontrollwerte für Myoglobin Centaur in ng/ml

Kontrolle	Mittelwert	Range
1	53,4	43,1-63,7
2	402	334-470
3	753	626- 880

2.1.4.3 Verdünner

2.1.4.3.1 Troponin

Multidiluent 11: Tris-Puffer und Ziegenserum

2.1.4.3.2 CK-MB und Myoglobin

Multi-Diluent 10: Tris-Puffer mit Natriumazid (<0,1%)

2.1.4.4 Sonstige Materialien

Cleaning Solution und Wash 1, Reagenz A (Säure) und Reagenz B (Base)

der Firma Bayer für die Chemilumineszenzreaktion.

2.1.5 IMMULITE Turbo (DPC Biermann)

2.1.5.1 Kalibratoren

Zwei Fläschchen (niedrig und hoch) der Firma DPC Biermann stehen zur Kalibration zur Verfügung. Es handelt sich um lyophilisiertes Troponin I in einer nichthumanen Serummatrix. Das Kalibrationsintervall ist alle 2 Wochen. Die Justierstandards werden wie Proben behandelt.

2.1.5.2 Kontrollen

Tabelle 8: Qualitätskontrollwerte für TnI IMMULITE Turbo

Kontrolle	Mittelwert	2SD-Bereich
CCC10007	0,58	<0,50-0,74
CCC20007	10,3	8,5-12,1

2.1.5.3 Verdünner

Troponin I- Verdünnungspuffer:

Troponin I-freie nichthumane Serummatrix zur manuellen Verdünnung der Patientenproben

2.1.5.4 Sonstige Materialien

Das Chemilumineszenz- Substrat beinhaltet einen Phosphatester des Adamantyldioxetan.

Weiterhin Reaktionsgefäße und ein Waschpuffer- und Reinigungs- Modul.

2.2 Methodik

Nachfolgend sind jeweils die nötigen Probenvorbereitungen sowie die allgemeinen Methoden der verwendeten Analyseverfahren aufgezeigt.

Für den Methodenvergleich wurden folgende Geräte verwendet:

- IMMULITE 2500
- ADVIA Centaur
- IMMULITE Turbo

2.2.1 Grundlegende Methodik

2.2.1.1 Methodik für den IMMULITE 2500 von DPC Biermann

Die IMMULITE 2500 Cardiacmarkerassays sind neue vollautomatische Sandwich- Chemiluminiszenz-Enzym-Immunoassays mit „logic driven Incubation“ (LDI)- Fähigkeit. Die „ Logic driven Incubation“- Methode (LDI-Methode) erlaubt aufgrund einer Verbesserung der Software einen effizienten Probendurchsatz durch kürzest mögliche Inkubationszeiten ohne Kompromisse in der Testleistung.

2.2.1.1.1 Probenvorbereitung

Ist die Probe tiefgefroren wird sie erst bei Zimmertemperatur aufgetaut. Jede Probe wird in einer Zentrifuge bei 4000 Umdrehungen pro Minute 12 Minuten zentrifugiert und dann zur Bearbeitung in den IMMULITE 2500 gegeben. Das Probenvolumen muss so groß sein, dass ein Totraumvolumen von 50 bis 100 µl vorhanden ist.

2.2.1.1.2 Funktionsanleitung IMMULITE 2500

Abbildung 3: IMMULITE 2500



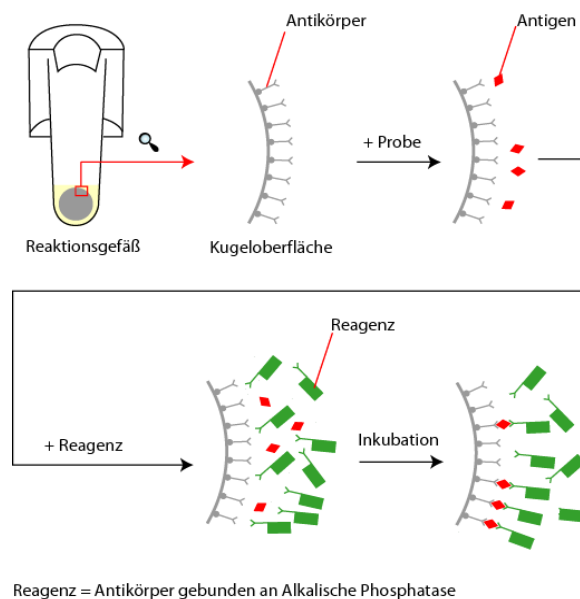
Am Beginn jedes Messtages wird der IMMULITE 2500 gespült, bevor die Kontrollen eingesetzt werden. Der IMMULITE 2500 hat 6 Racks (A-F) mit jeweils 15 Positionen. Die Patientenprobe ist barcodiert und wird von dem Gerät eingelesen. Hat das Gerät den Barcode erkannt, kann der gewünschte Test softwaregesteuert angefordert werden. Der IMMULITE 2500 verwendet eine Pipette, die nach jedem Pipettiervorgang gereinigt wird. Diese Pipette hat einen Clotdetektor. Falls die Pipette verstopft ist, wird der Pipettiervorgang unterbrochen.

Ein Kit enthält einen barcodierten Kugelcontainer mit 200 Polystyrolkugeln, die mit einem monoklonalen Antikörper der Maus beschichtet sind. Dieser Antikörper ist gegen die Epitope 24-40 und 80- 110 der herzspezifischen N-terminalen Region des Troponinmoleküls gerichtet⁹⁸. Weiterhin enthält das Kit einen barcodierten Reagenzbehälter mit polyklonalen Antikörpern (Maus bzw. Ziege) gebunden an alkalische Phosphatase (Rinderkalbsdarm). Dieser ist ebenso für 200 Tests ausgerichtet. Desweiteren befinden sich in dem Kit für den Test spezifische Kalibratoren (niedrig und hoch), lyophilisiertes CK-MB und Myoglobin bzw. cTnI in einer nichthumanen Serummatrix.

Bei den Tests zur Bestimmung von cTnI, CK-MB und Myoglobin handelt es sich um Sandwich-Immuno-Assays.

Für Sandwich Assays gilt eine direkte Proportionalität: Je mehr Moleküle des zu messenden Parameters in der Patientenprobe vorhanden sind umso mehr binden an die Polystyrolkugel. Das wiederum bedeutet, dass auch mehr des zweiten markierten Antikörpers an der Kugel festgehalten wird und dementsprechend mehr alkalische Phosphatase gebunden ist. Je mehr alkalische Phosphatase nach den Waschschritten an der Kugel gebunden ist, umso mehr Photonen werden nach der Substratzugabe freigesetzt und umso höher sind die gemessenen „Counts per second“ (CPS) für die Patientenprobe. Das heißt hohe CPS-Werte stehen in direkter Korrelation zu einer höheren Konzentration der Antikörper in der Probe und umgekehrt.

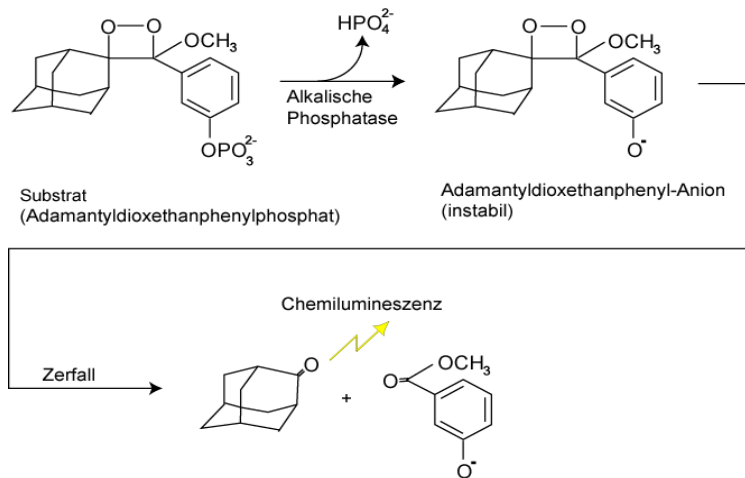
Abbildung 4: Bildung eines Sandwichkomplexes im IMMULITE 2500³⁰



Das Ergebnis erhält man 15 Minuten nachdem das Serum hinzugegeben wurde. Am Ende eines Messtages wird der IMMULITE 2500 mit dem Reinigungsmodul gereinigt.

Testanleitung für kardiales Troponin I

1. Die TPI- Kugel wird in die Küvette gegeben. Die Kugel ist mit monoklonalen Antikörpern (Maus) gegen Troponin I beschichtet.
2. 100µl der Proben werden zusammen mit dem Reagenz hinzugefügt. Das Reagenz enthält polyklonale Troponin I-Antikörper (Ziege), die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind.
3. In der 10minütigen Inkubationszeit, setzt sich das Troponin I aus der Probe an die Antikörper auf der TPI-Kugel und gleichzeitig bindet es mit der alkalischen Phosphatase des Reagenz (Sandwich-Immunkomplex). Je mehr Troponin in der Probe, umso mehr Immunkomplexe befinden sich jetzt in der Küvette.
4. Überschüssiges, ungebundenes Reagenz und Patientenprobe werden entfernt. Das Reaktionsgefäß wird zur Entfernung aller Flüssigkeit bei hoher Geschwindigkeit erneut zentrifugiert. Anschließend wird destilliertes Wasser in das Reaktionsgefäß injiziert und erneut zentrifugiert. Dieser Zentrifugal-Waschschrift wird mehrere Male wiederholt.
5. 200µl Chemilumineszenzsubstrat werden hinzugefügt und inkubiert. Das Substrat, ein Phosphatester des Adamantyldioxetan wird in der Anwesenheit von alkalischer Phosphatase hydrolysiert und man erhält ein instabiles Zwischenprodukt. Die kontinuierliche Produktion dieses Zwischenproduktes führt zu einer anhaltenden Lichtfreisetzung (Photonenemission), die gemessen wird.

Abbildung 5: Chemilumineszenz-Reaktion des IMMULITE 2500³⁰

6. Dazu wird das Reaktionsgefäß direkt vor den Photomultiplier (5 Minuten nachdem das Substrat hinzugegeben wurde) bewegt und die Licht (Photonen-) emission in „counts per second“ (CPS) übertragen. Die CPS können in die Konzentration des Analysates umgerechnet werden.

Zur Einordnung der Messwerte dient der Vergleich mit einer Standardkurve. Diese Standardkurve wird vom Hersteller ermittelt und ist spezifisch für jedes Kitlot. Über einen Kitbarcode wird diese in das Gerät eingelesen.

Der Messbereich liegt zwischen 0,15 und 100 ng/ml.

Testanleitung für CK- MB

Die einzelnen Schritte verlaufen genau wie bei dem Test für cTnI. Die CK- MB-Kugel ist mit monoklonalen Antikörpern (Maus) gegen CK- MB beschichtet und das Reagenz enthält ligand-markierte CK- MB-Antikörper (monoklonal Maus) und mit alkalischer Phosphatase (Rinderkalbsserum) konjugierte monoklonale anti-CK- BB Mausantikörper. Es werden nur 50µl Probe benötigt.

Der Messbereich liegt zwischen 0,4 und 500 ng/ml.

Testanleitung für Myoglobin

Der Test entspricht der Anleitung für cTnI. Die Myoglobin-Kugel ist mit einem monoklonalen Myoglobin-Antikörper (Maus) beschichtet und das Reagenz enthält einen polyklonales Myoglobinantikörper (Ziege), der mit alkalischer Phosphatase (Rinderkalbsserum) konjugiert ist. Bei diesem Test werden nur 10µl benötigt.

Der Messbereich liegt zwischen 2 und 800 ng/ml.

2.2.1.2 Methodik am ADVIA Centaur

Das ADVIA Centaur System besteht aus einem vollautomatischen Immunoassay-Analysegerät. Zu den Testgruppen gehören Reproduktion, Schilddrüsenfunktion, Tumormarker, Herz-Kreislauf, Anämie, Medikamente, Knochenstoffwechsel, Allergie und Nebennierenfunktion. Alle Assays arbeiten mit direkter Chemilumineszenz-Technologie. Reagenzien, Proben und Vorräte können ununterbrochen eingeladen werden, so dass das System stets einsatzbereit ist.

2.2.1.2.1 Probenvorbereitung

Die Probe wird entsprechend der Probenvorbereitung des IMMULITE 2500 behandelt. Die Probe muss so groß sein, dass sie ein Totraumvolumen von 100 µl hat.

2.2.1.2.2 Funktionsweise des ADVIA Centaur (Bayer)

Abbildung 6: ADVIA Centaur



Durch den vollautomatischen ADVIA Centaur der Firma Bayer Vital GmbH, Fernwald, können Myoglobin, CK- MB und Troponin I mittels eines direkten chemiluminometrischen Sandwich-Immunoassays gemessen werden.

Der Centaur hat 60 Racks, in jedes Rack können jeweils 5 Proben eingestellt werden. Jedes Rack hat einen Barcode und jede Position eine Nummer (Beispiel: Rack B, Position 3). Somit erhält man eine eindeutige Zuordnung der Proben.

Für jeden neuen Pipettierschritt verwendet der Centaur eine neue Pipettenspitze.

Bei der chemiluminometrischen Messung wird Energie in Form von Licht frei^{139, 166, 173-175}, dieses ist bei dem Sandwichtest direkt proportional zu der Menge des zu messenden Stoffes. Die Lichtemission wird in relativen Lichteinheiten (RLU= Relative Light Units) angegeben.

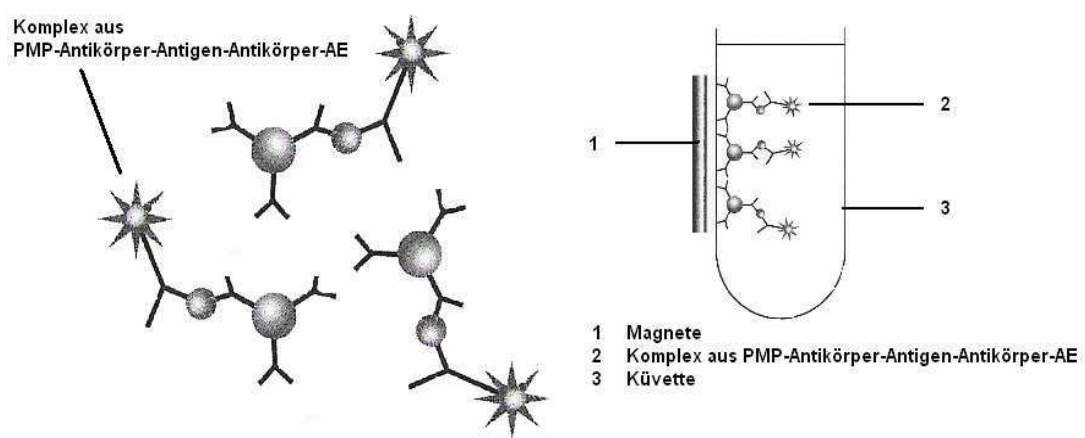
Je höher die RLU, desto höher ist die Konzentration des Analyten.

Der Centaur arbeitet mit dem Acridiniumester (AE) als Chemilumineszenzmarker. Dieses AE befindet sich im Lite-Reagenz und ist kovalent an einen Antikörper gebunden, welcher an das Antigen bindet. Das Antigen ist der zu messende Parameter. Die Bindung zwischen dem Antikörper und dem Antigen wird durch das AE nicht beeinflusst und durch seine geringe Größe werden kaum Bindungsstellen blockiert⁵⁶.

Für die Trennung werden Paramagnetische Partikel PMP (Eisenoxidkristalle) aus der Solid- Phase (oder auch Festphase genannt) verwendet, die sich während der Inkubationszeit an die Antikörper binden und in einem magnetischen Feld festgehalten werden. Bei dem sich anschließenden Waschvorgang werden die Bestandteile, die nicht an PMP gebunden haben, abgewaschen.

Die Probe besteht jetzt aus einem Komplex aus PMP-Antikörper-Antigen-Antikörper-AE.

Abbildung 7: Komplex aus PMP- Antikörper- Antigen- Antikörper- AE²⁷



Durch den Zusatz von Säure und Base wird jetzt die Chemilumineszenzreaktion ausgelöst.

Testanleitung für kardiales Troponin I

Das Gerät hält immer eine konstante Menge zweier Antikörper bereit, der erste ist im Lite- Reagenz und der zweite in der Festphase.

Lite- Reagenz: polyklonaler Ziege-Anti-Troponin- I- Antikörper, mit Acridiniumester (AE) markiert

Festphase: monoklonaler Maus-Anti-Troponin I-Antikörper, dieser ist kovalent an PMP gebunden

1. 100 µl Probe und 100 µl Lite-Reagenz werden von dem Gerät in eine Küvette gegeben und 2,5 Minuten bei 37°C inkubiert .
2. 200 µl Festphase kommen hinzu und eine Inkubationszeit von 5,0 Minuten bei 37°C schließt sich an.
3. Der nächste Schritt ist das Trennen der nichtgebundenen Bestandteile mit Hilfe von PMP und das Waschen der Küvette mit entionisiertem Wasser.
4. Durch Zugabe von jeweils 300 µl Reagenz A (Säure) und Reagenz B (Base) kommt es zur Chemilumineszenz- Reaktion.

Der Messbereich liegt zwischen 0,1 bis 50 ng/ml.

Testanleitung für CK- MB

Lite- Reagenz: monoklonaler Maus- Anti- CK-MB- Antikörper, mit Acridiniumester markiert

Festphase: monoklonaler Maus- Anti- CK- BB- Antikörper, kovalent an PMP gebunden.

Die folgenden Schritte führt das System vollautomatisch durch:

1. Es werden 100 µl der Probe und 50 µl Lite-Reagenz in eine Küvette pipettiert, diese wird 5 Minuten bei 37°C inkubiert.
Es entsteht ein AG-AK-Komplex aus dem CK-MB als Antigen und dem mit AE beschichteten Antikörper.
2. Als nächstes werden 225 µl Festphase hinzugegeben und wiederum für 2,5 Minuten bei 37°C inkubiert.
Der an einen Antikörper gebundene paramagnetische Partikel verbindet sich mit CK-MB über das Biotin des Antikörpers.
3. Im nächsten Schritt wird das Nichtgebundene in einem magnetischen Feld getrennt, aspiriert und die Küvette mit entionisierten Wasser gereinigt.
4. Um die Chemilumineszenz- Reaktion auszulösen werden nun jeweils 300 µl Reagenz A (Säure) und Reagenz B (Base) hinzugefügt. Das AE wird oxidiert, wobei Licht entsteht.

Der Messbereich liegt zwischen 0,18 bis 300 ng/ml

Testanleitung für Myoglobin

Lite- Reagenz: polyklonaler Ziege-Anti-Myoglobin-Antikörper mit AE
markiert

Festphase: monoklonaler Maus-Anti-Myoglobin-Antikörper kovalent
gebunden an PMP

Die folgenden Schritte führt das System vollautomatisch durch:

1. 10 µl Probe werden zusammen mit 100 µl Lite-Reagenz in eine Küvette pipettiert und 2,5 Minuten bei 37°C inkubiert.
2. Nun pipettiert der Centaur 200 µl Festphase. Inkubationszeit bei 37°C 5 Minuten.
3. Mit Hilfe des PMP und eines Magnetfeldes werden nun die nicht gebunden Anteile abgetrennt und die Küvette mit entionisierten Wasser gewaschen.
4. 300 µl Reagenz A (Säure) und Reagenz B (Base) werden hinzugefügt und die AE wird oxidiert und die Lichtemission gemessen.

Der Messbereich liegt zwischen 3 bis 1000 ng/ml.

2.2.1.3 Methodik für den IMMULITE Turbo

Es handelt sich hierbei um ein vollautomatische Chemilumineszenz-Immunoassay System.

2.2.1.3.1 Probenvorbereitung

Die Probe muss so viel Material enthalten, dass ein Totraumvolumen von 100µl vorhanden ist.

2.2.1.3.2 Funktionsanleitung IMMULITE Turbo

Abbildung 8: IMMULITE Turbo



Der IMMULITE Turbo wird am Beginn eines Werktages gespült, und es werden die Kontrollen gemessen, die wie Proben behandelt werden.

Das Gerät besitzt ein Probenkarussell mit 60 Positionen. Das Reagenzienkarussell kann bis zu 12 Reagenzienbehälter aufnehmen, auf diese Weise können 12 unterschiedliche Test durchgeführt werden. Der IMMULITE Turbo verwendet eine Pipette, die nach jeder Pipettierung gespült wird.

In dem Kit für die Bestimmung von cTnI befinden sich Turbo Troponin I-Teströhrchen, die eine mit monoklonalen Anti-Troponin I-Mausantikörper beschichtete Kugel enthalten und ein Troponin I- Reagenz, welches aus

polyklonalen Anti-Troponin I Antikörpern konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Rinderkalbsdarm) besteht. Des Weiteren die schon oben beschriebenen Kalibratoren.

Das Substrat, das als letzter Schritt hinzupipettiert wird, ist ein Adamantyldioxetanphosphat, welches ein anhaltendes Lichtsignal hervorruft.

Die ausgesendete Lichtmenge ist direkt proportional zur Menge der gebundenen alkalischen Phosphatase und damit auch zur Menge an Troponin I in der Patientenprobe (immunometrischer Assay). Das Lumineszenzsignal wird in counts per second (CPS) gemessen. Es wird mit Hilfe einer Eichkurve in die korrespondierende Konzentration an Troponin I umgewandelt und ausgedruckt.

Das erste Ergebnis wird nach 15 Minuten, die Ergebnisse für alle weiteren Proben alle 45 Sekunden ausgegeben.

Testanleitung für cTnI

1. Dem Teströhrchen mit der Antikörper- beschichteten Kugel wird 100 µl Serum und das Reagenz hinzugefügt.
2. Es schließt sich eine sechsminütige Inkubationszeit bei 37°C an, in der das Troponin I aus der Patientenprobe an den Antikörper auf der Kugel bindet. Gleichzeitig bindet der mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper aus dem Reagenz an das Probentroponin. Es entsteht ein Sandwichimmunoassay.
3. Es folgen mehrere Waschschrte, in denen das nichtgebundene Material ausgewaschen und abzentrifugiert wird.
4. 200 µl Substrat werden hinzugegeben, das durch die alkalische Phosphatase in ein instabiles Zwischenprodukt umgebaut wird und beim Zerfall Photonen absendet.
5. Die Photonen werden mit dem Photomultiplier gemessen.

Der Messbereich liegt zwischen 0,15 und 100 ng/ml.

2.2.2 Analytische Evaluierung

Ziel der analytischen Evaluierung des IMMULITE 2500 war, zu testen, ob der IMMULITE 2500 der Firma DPC Biermann analytisch zuverlässig und somit in der klinischen Routinediagnostik einsetzbar ist. Die Evaluierung bestand aus folgenden Teilen.

- Präzisionsbestimmung (Inter- und Intra- Assay)
- Verdünnungslinearität
- Verschleppung
- Methodenvergleich
- Stabilität

2.2.2.1 Inter- Assay (IMMULITE 2500)

Mit Hilfe dieser Studie wird in einer unabhängigen Versuchsreihe überprüft, ob der IMMULITE 2500 bei gleichen Patientenproben an aufeinander folgenden Tagen zu annähernd gleichen Ergebnissen kommt. Hierbei wurde Probenmaterial (Serum/heparinisiertes Plasma, Kontrollmaterial) einer bestimmten Konzentration der jeweiligen Parameter an 11 bzw. 18 aufeinander folgenden Tagen bestimmt. Bei den Kontrollen (CK-MB, Myoglobin und cTnI) gab es jeweils low (für den unteren Messbereich) und high (für den oberen Messbereich). Die Patientenproben wurden in vier unterschiedlichen Konzentrationen gemessen.

Um genügend Material einer bestimmten Konzentration zu bekommen, wurden verschiedene Patientenproben ähnlicher Konzentration gemischt und in der Zentrifuge zentrifugiert. Dieses so gewonnene Material wurde nun in Plastikreagenzgläser mit den jeweiligen Volumina, die der IMMULITE 2500 für den jeweiligen Test benötigt plus Totraumvolumen abgefüllt und bis auf das erste Röhrchen im Gefrierschrank bei - 24°C aufbewahrt. Das erste Röhrchen wurde zentrifugiert und gleich gemessen. Die anderen wurden auf den darauffolgenden Tagen bei Raumtemperatur aufgetaut, zentrifugiert und

gemessen. Die erhaltenden Messwerte wurden in eine Excel-Tabelle eingegeben und mit Hilfe des Excel-Programmes der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient ermittelt.

2.2.2.2 Intra- Assay (IMMULITE 2500)








Zur Bestimmung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten in Serie am gleichen Tag, um zu überprüfen, ob der IMMULITE 2500 bei einer mehrmaligen Messung einer Probe annähernd gleiche Werte liefert. Hierbei wurde Patientenmaterial (Serum oder heparinisiertes Plasma) und Kontrollen mit bestimmten Konzentrationen in Serie, dass heißt 20 Bestimmungen hintereinander, gemessen. Für die Kontrollen (CK-MB, Myoglobin und cTnI) wurde low und high bestimmt. Bei den Patientenproben wurde bei CK-MB ganz niedrig, niedrig, mittel und hoch bestimmt. Für Myoglobin und cTnI: niedrig, mittel und hoch. Um auch hier wieder genügend Material einer bestimmten Konzentration zur Verfügung zu haben, wurde wie bei der Inter-Studie verfahren. Die Auswertung erfolgte auch hier mit dem Excel-Programm.

2.2.2.3 Linearität

Beim Testen dieser Eigenschaft geht es darum, eine Serumprobe mit relativ hoher Konzentration in definierten Schritten zu verdünnen, um dann bestimmen zu können, ob die gemessenen Werte am IMMULITE 2500 den Gesetzen der Linearität folgen.

Bei diesem Test wurde zunächst eine Verdünnungsreihe per Hand angefertigt und diese dann mit dem IMMULITE 2500 in Doppelbestimmung nachbestimmt. Anhand eines Excel-Diagrammes wurde dieser Test ausgewertet.

Tabelle 9: Verdünnungsreihe für Linearität von Troponin, CK-MB und Myoglobin am IMMULITE 2500

Konzentrationsstufe	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Verdünnungsverhältnis	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Serumvolumen (in µl)	400	200							
Und 200 µl Diluent		200	200	200	200	200	200	200	200
Volumen für nächste Verdünnung (in µl)		200	200	200	200	200	200	200	

2.2.2.4 Verschleppung

Mit diesem Test wurde untersucht, ob der IMMULITE 2500 eine Verschleppung von vorher bestimmten hohen Probenwerten in eine niedrige Probe hat. Dies würde zu falsch positiven Werten führen. Wenn eine Verschleppung vorliegen würde, hätte man den Verdacht, dass die Pipetierneedle nicht ordentlich gesäubert würde.

Bei der Durchführung des Testes wurde ein hoher Wert und ein niedriger Wert jeweils 10 mal hintereinander gemessen, wobei mit dem hohen Wert begonnen wurde. Zur Auswertung wurde mit Hilfe des Excel-Programmes der Variationskoeffizient VK, die Standardabweichung SD und Mittelwert MW bestimmt. Desweiteren wurde ein Excel-Diagramm angefertigt.

2.2.2.5 Methodenvergleich

Die während des klinischen Teils mittels unterschiedlicher Geräte/ Assays gemessenen Seren wurden retrospektiv ausgewertet. Ziel war es, zu zeigen, ob der IMMULITE 2500 eine gute Korrelation zu den Geräten, die schon in der Routinearbeit verwendet werden, hat. Um Korrelationen im wichtigeren, niedrigen Messbereich zu finden, wurden die Berechnungen auch für den niedrigen Messbereich ($< 0,5$ ng/ml) durchgeführt.

Der Methodenvergleich wurde mit dem IMMULITE 2500 von DPC Biermann und dem ADVIA Centaur von Bayer durchgeführt. Für den Parameter cTnI zusätzlich noch mit dem IMMULITE Turbo von DPC Biermann. Die Bestimmungen erfolgten an beiden bzw. bei allen drei Geräten an einem Tag. Für cTnI sind 140 Proben gemessen worden, die in dem Bereich von 0 bis 90 ng/ml lagen. Bei CK-MB sind 224 Proben bis 500 ng/ml verwendet worden und für Myoglobin 250 Proben bis 800 ng/ml.

Die Proben wurden aus der laufenden Routine entnommen, abpipetiert, archiviert und bei -24°C eingefroren. Die Auswertung erfolgte nach Bablok-Passing und Bland-Altman.

2.2.2.6 Stabilität (nur für cTnI) oder Einfluss von Lagerungsdauer und -bedingungen

Ein wesentliches Qualitätsmerkmal in der labormedizinischen Diagnostik ist die Kenntnis über den Einfluss von Lagerungsbedingungen auf den Analyten.

Für die Stabilität wurden 8 Proben aus der Routine entnommen und zunächst nach einer Stunde dann dreimal nach jeweils einer halben Stunde gemessen. Vier davon wurden über Nacht in den Kühlschrank bei 6°C und die anderen über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, dabei wurden die Röhrchen mit einem Stopfen verschlossen. Am nächsten Tag wurden die Proben 1-4 mal gemessen, je nachdem wie viel Material noch vorhanden war. Die Messungen erfolgten nach 22, 23, 25 und 26 Stunden, während dieses Messraumes standen die Proben bei Zimmertemperatur. Vor jeder Messung wurde die Probe zentrifugiert. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und VKs sind mit Hilfe einer Excel- Tabelle bestimmt worden.

2.2.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Auswertung der Testreihen wurde Microsoft Excel verwendet. Für die Auswertung des Methodenvergleichs wurde die Methode nach Bablok-Passing genutzt.

Als weitere statistische Auswertung wurde das Verfahren nach Bland-Altman³¹ angewendet.

Mit diesem statistischen Verfahren soll die Zuverlässigkeit und der Grad der Übereinstimmung (Limits of Agreement, LOA) zweier unterschiedlicher Messmethoden in klinischen Studien ermittelt werden. Dabei werden, anders als bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten, keine Absolutwerte verwendet. Man berechnet zunächst die Differenzen aller Messpaare und trägt diese gegen den Durchschnitt der Mittelwerte der Methoden auf. Aufgrund der Annahme, dass beide Messwerte gleich gut oder schlecht sind, wird als der beste Schätzwert der Mittelwert der beiden Messmethoden gewählt. Damit ergeben sich Hinweise, ob es systematische Unterschiede zwischen den beiden Messtechniken gibt.

Die mittlere Differenz ergibt die Abweichung (Bias) zwischen den beiden Messmethoden. Es wird für eine ausreichende Messgenauigkeit gefordert, dass sich die Abweichung des Mittelwerts des getesteten Messverfahrens vom Mittelwert der Summe der Mittelwerte maximal im Rahmen von ± 2 Standardabweichungen (SD) bewegen sollte.

Diese Grenzen des Übereinstimmungsbereiches („Limits of Agreement“ (LOA)) im Bereich von ± 2 SD vom Mittelwert der oben beschriebenen Differenz werden folgendermaßen berechnet:

$$\text{LOA1} = \text{Bias} - 2\text{SD}$$

$$\text{LOA2} = \text{Bias} + 2\text{SD}$$

3 Ergebnisse zur analytischen Evaluierung

3.1 Kardiales Troponin- I-Studie

3.1.1 Inter-Assay- Präzision

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Inter- Präzision- Studie aufgeführt. Die Differenz der Fallzahl der Messung liegt daran, dass unterschiedlich viel Probenmaterial vorhanden war.

Tabelle 10: Ergebnisse der Inter- Präzision- Studie

Troponin	Patienten			Kontrolle	
	niedrig	mittel	hoch	Level 1	Level 2
N	13	14	11	17	17
Mittelwert in ng/ml	1,4	41,2	93,4	0,8	11,3
SD in ng/ml	0,1	4,3	4,7	0,1	0,6
VK in %	8,3	10,3	5,0	10,0	6,0

Die Variationskoeffizienten (VK) der Messungen der Patientenproben, wie auch die der Kontrollen liegen alle, bis auf die mittlere Patientenkonzentration mit 10,3%, in einem Bereich von 5,0- 10,0%.

3.1.2 Intra- Assay- Präzision

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der Intra- Präzision- Messung dargestellt. Die Fallzahl betrug hier überall n= 20.

Tabelle 11: Ergebnisse der Intra- Präzision- Studie

Troponin	Patienten			Kontrollen	
	niedrig	mittel	hoch	Level 1	Level 2
N	20	20	20	20	20
Mittelwert in ng/ml	1,0	40,3	90,9	0,8	13,3
SD in ng/ml	0,1	1,7	3,4	0,0	0,4
VK in %	4,6	4,1	3,7	5,3	3,3

Die Variationskoeffizienten (VK) der Messungen der Patientenproben, wie auch die der Kontrollen liegen alle unter 10% in einem Bereich von 3,3- 5,3%.

3.1.3 Linearität

In den Abbildungen 9 und 10 sind die gemessenen Werte der Verdünnungsreihen am IMMULITE 2500 gegen die berechneten Werte aufgetragen.

Abbildung 9: 1. Verdünnungsreihe Troponin I

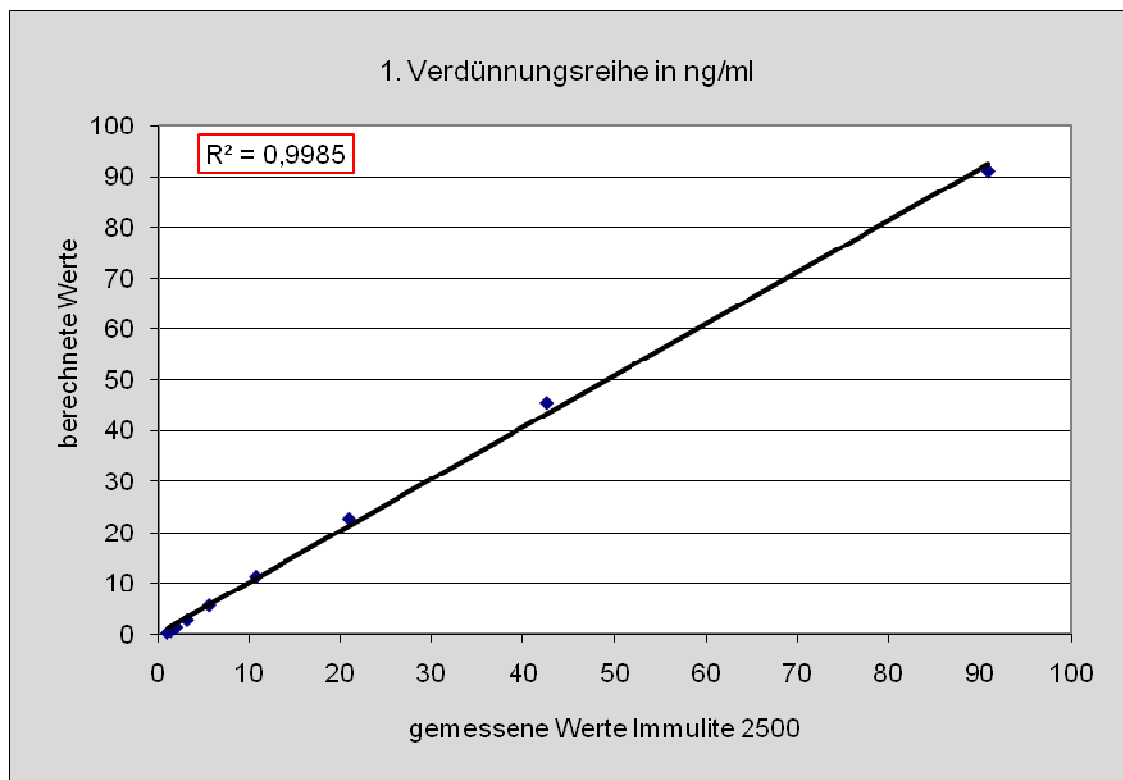
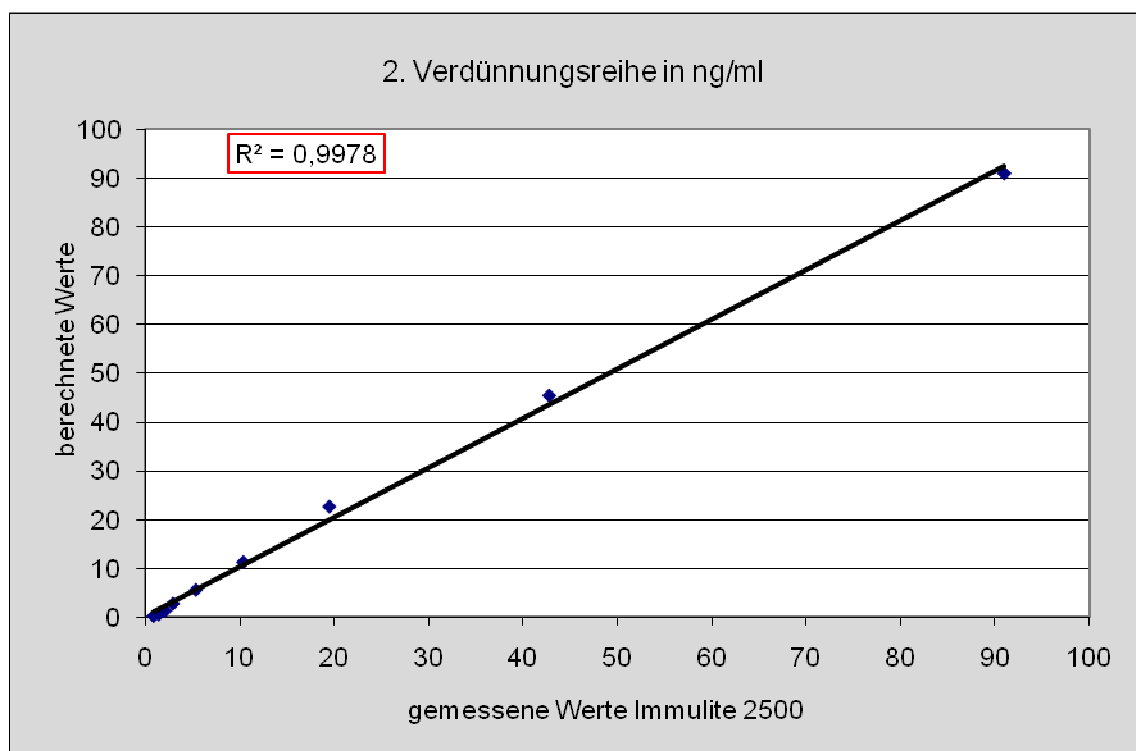


Abbildung 10: 2. Verdünnungsreihe Troponin I



3.1.4 Verschleppung

In der Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Verschleppung dargestellt. Die hohe und die niedrige Probe wurden im Wechsel gemessen, begonnen wurde mit der hohen Probe.

Tabelle 12: Ergebnisse der Verschleppung

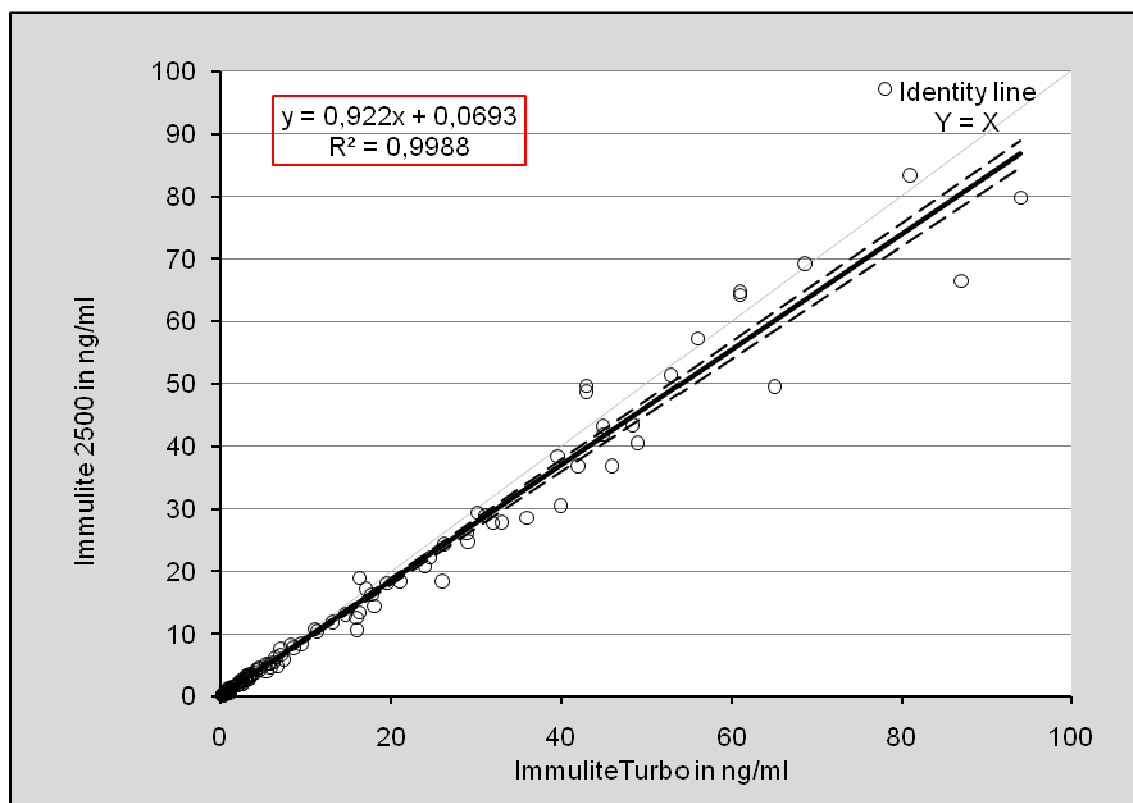
Messung	hohe Probe	niedrige Probe
1	83,5	0,72
2	78,2	0,84
3	72,6	0,72
4	79,2	0,78
5	82,3	0,75
6	82	0,72
7	78,4	0,75
8	79,2	0,79
9	75,7	0,73
Mittelwert in g/ml	79,01	0,76
SD in ng/ml	3,34	0,04
VK in %	4,24	5,11

Die Ergebnisse der Verschleppung zeigen, dass die niedrige Probe nicht durch die hohe Probe beeinflusst wurde. Es ist kein systematischer Anstieg der niedrigen Probe erkennbar. Die Variationskoeffizienten liegen bei 4,24% (hohe Probe) bzw. 5,11% (niedrige Probe).

3.1.5 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich zwischen den IMMULITE 2500 und IMMULITE Turbo zeigt einen sehr guten Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,9988$ bei einer Probenanzahl von $n = 125$. Die Messwerte des IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur korrelieren gut miteinander ($R^2 = 0,9948$), die Fallzahl betrug hier $n = 141$. Diese Korrelationen werden in den folgenden Abbildungen dargestellt.

Abbildung 11: Bablok- Passing Troponin I IMMULITE 2500 und IMMULITE Turbo



Zur Berechnung des Schnittpunktes setzt man $x=y$:

$$x = 0,922x + 0,0693$$

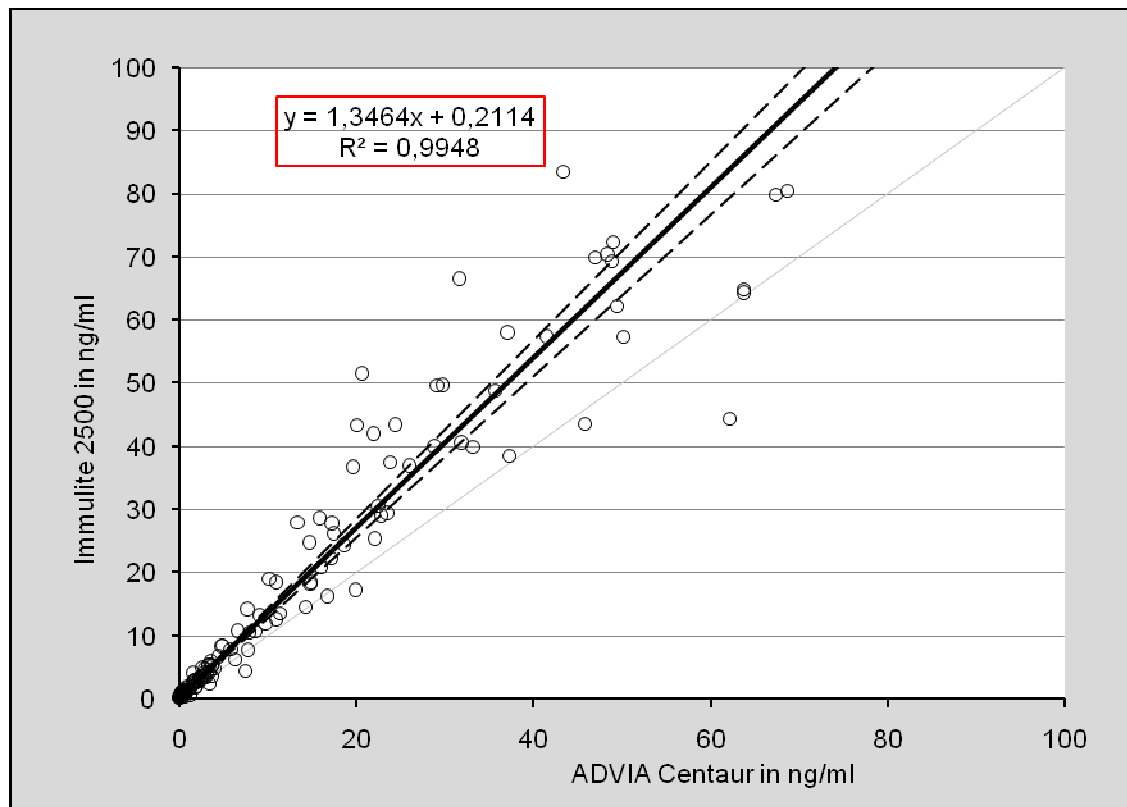
$$x(1-0,922) = 0,0693$$

$$x = 0,00693 / (1 - 0,922)$$

$$x = 0,89$$

Dies bedeutet, dass der IMMULITE 2500 bis 0,89 ng/ml höher misst als der IMMULITE Turbo, ab dem Messwert von 0,89 ng/ml dann niedriger. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,9988$ korrelieren die Methoden gut miteinander.

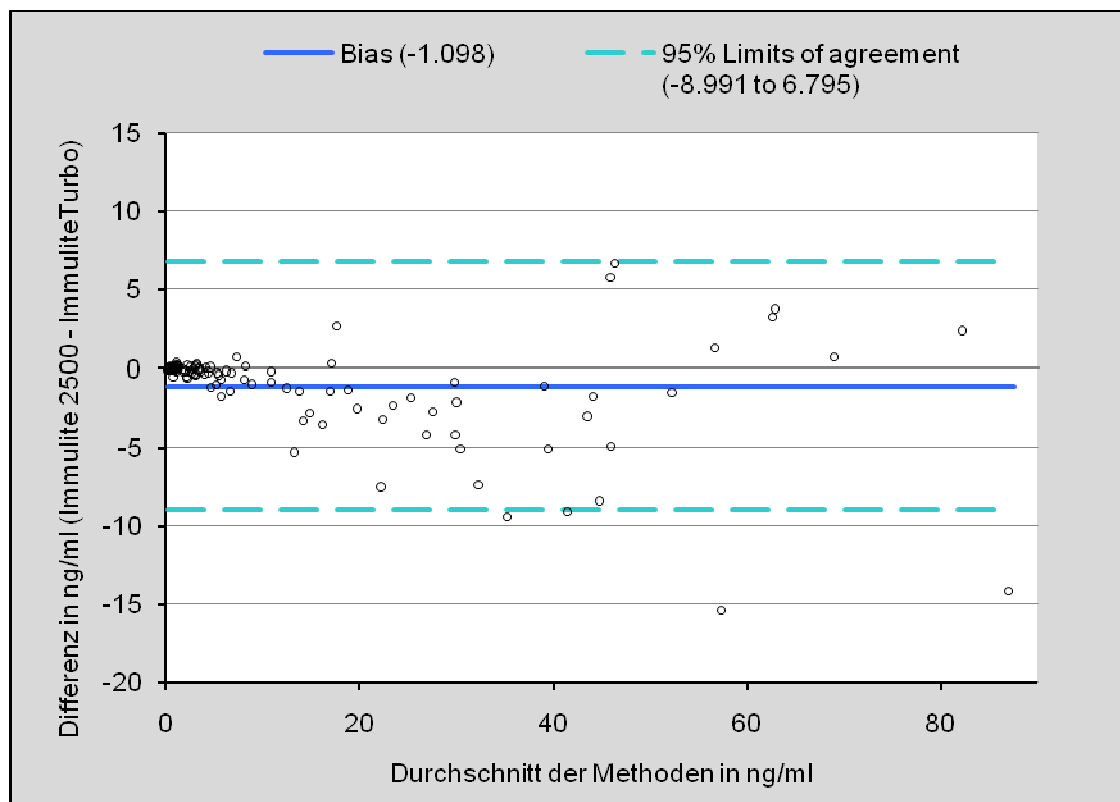
Abbildung 12: Bablok- Passin Troponin I IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur



Der Korrelationskoeffizient beträgt $R^2 = 0,9948$. Die beiden Methoden korrelieren gut miteinander.

Mit einer Regressionsgeradengleichung von $y = 1,3464 + 0,2114$ bedeutet das, dass der IMMULITE 2500 immer höher misst als der ADVIA Centaur.

Abbildung 13: Bland- Altman für Troponin I IMMULITE 2500 und IMMULITE Turbo



Die durchgezogene Linie zeigt die mittlere Differenz (Bias) an. Diese Abweichung ist wie die Abbildung zeigt mit einem Bias von – 1,098 ng/ml ins Negative verschoben.

Durch diese nach Bland- Altman berechnete Differenz liegen Messungen mit dem IMMULITE 2500 im Vergleich zu dem ADVIA Centaur durchschnittlich um – 1,098 ng/ml niedriger.

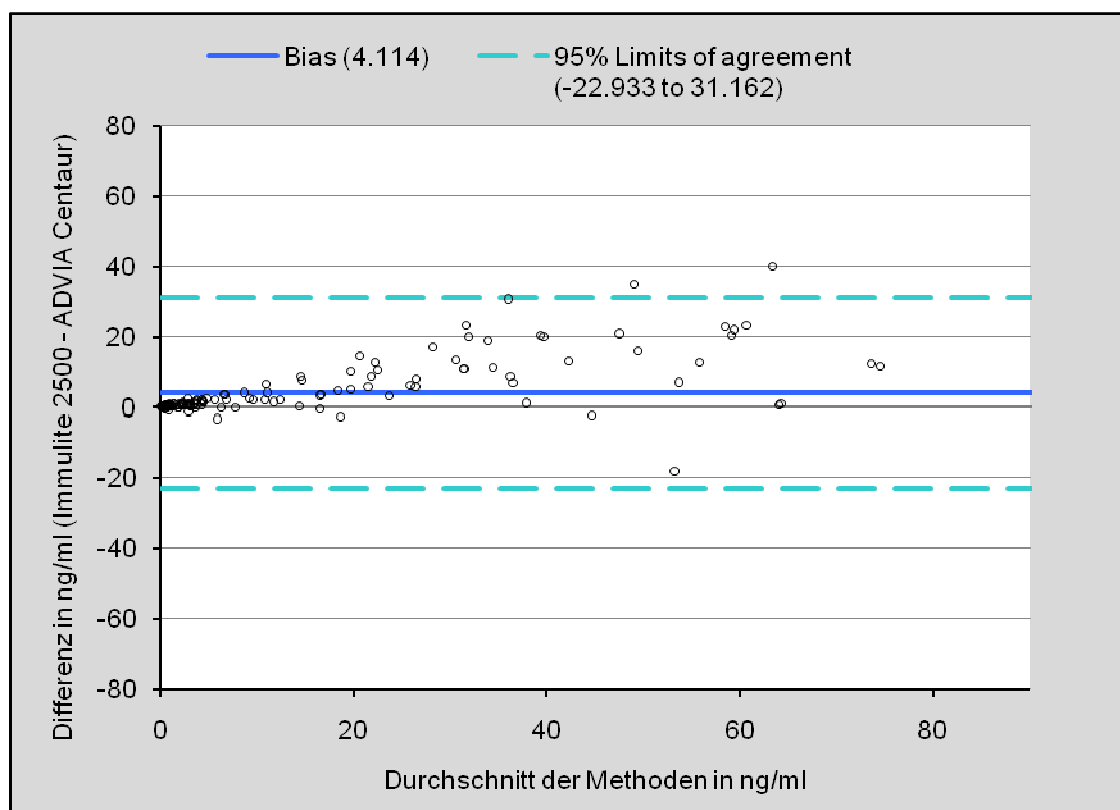
Der Übereinstimmungsbereich nach Bland Altman mit 95% Wahrscheinlichkeit beträgt:

$$\text{LOA1} = \text{Bias} - 2\text{SD} = -1,098 - 7,893 = -8,991$$

$$\text{LOA2} = \text{Bias} + 2\text{SD} = -1,098 + 7,893 = 6,795$$

Die Werte streuen bis auf fünf Ausnahmen im Bereich der zweifachen Standardabweichung (gestrichelte Linien) um diese mittlere Differenz. Das bedeutet, dass ca. 95,7 % der Werte (insgesamt 141 Wertepaare) innerhalb dieser Standardabweichung liegen.

Abbildung 14: Bland-Altman für Troponin I IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur



Die durchgezogene Linie zeigt die mittlere Differenz (Bias) an. Diese Abweichung ist wie die Abbildung zeigt mit einem Bias von 4,114 ng/ml ins Positive verschoben.

Durch diese nach Bland-Altman berechnete Differenz liegen Messungen mit dem IMMULITE 2500 im Vergleich zum ADVIA Centaur durchschnittlich um 4,114 ng/ml höher.

Der Übereinstimmungsbereich nach Bland Altman mit 95% Wahrscheinlichkeit beträgt:

$$\text{LOA1} = \text{Bias} - 2\text{SD} = 4,114 - 27,047 = -22,933$$

$$\text{LOA2} = \text{Bias} + 2\text{SD} = 4,114 + 27,048 = 31,162$$

Die Werte streuen bis auf zwei Ausnahmen im Bereich der zweifachen Standardabweichung (gestrichelte Linien) um diese mittlere Differenz. Das bedeutet, dass ca. 98,6 % der Werte (insgesamt 141 Wertepaare) innerhalb dieser Standardabweichung liegen.

3.1.6 Stabilität

In den nachfolgenden Tabellen sind acht Proben unterschiedlicher Konzentration fünfmal am ersten Tag gemessen worden, während dieser Wartezeit standen die Proben bei Raumtemperatur. Vier von den Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen und die anderen vier in den Kühlschrank bei 6°C gestellt. Am zweiten Tag wurde die Messung noch viermal wiederholt. Vor jeder Messung sind die Proben gemischt und zentrifugiert worden.

Tabelle 13: Stabilitätsmessung (über Nacht bei Raumtemperaturen)

		Pr. 1	rel. Abw.	Pr. 2	rel. Abw.	Pr. 3	rel. Abw.	Pr. 4	rel. Abw.
	Std.		zu 100 %		zu 100 %		zu 100 %		zu 100 %
1	0	3,4	0,0	1,3	0,0	3,5	0,0	0,3	0,0
2	1	3,5	3,3	1,1	14,5	3,4	2,6	0,2	22,6
3	1,5	3,2	4,5	1,3	0,0	3,2	8,5	0,2	29,0
4	2	3,6	7,5	1,2	6,1	3,4	4,3	0,3	6,5
5	2,5	3,5	5,8	1,3	0,8	3,3	6,0	0,2	29,0
6	22	2,9	14,0	1,1	16,0	2,9	18,1	<0,2	< 35,5
7	23	3,0	11,9	1,2	10,7	2,9	17,6	<0,2	< 35,5
8	25	2,9	13,4	1,1	13,00	2,9	16,7	<0,2	< 35,5
9	26,5	3,0	10,8	1,1	13,8	2,9	17,6	n.d.	n.d.
	MW	3,2	8,0	1,2	8,3	3,2	10,1	0,3	17,4
	SD	0,3	4,6	0,1	6,3	0,2	6,9	0,0	12,0
	VK %	8,5		6,9		7,7		14,5	

n.d. nicht durchgeführt

Tabelle 14: Stabilitätsmessung (über Nacht im Kühlschrank 6°C)

		Pr. 5	rel. Abw. zu 100 %	Pr. 6	rel. Abw. zu 100 %	Pr. 7	rel. Abw. zu 100 %	Pr. 8	rel. Abw. zu 100 %
	Std.								
1	0	12,6	0,0	17,3	0,0	1,1	0,0	1,5	0,0
2	1	13,9	10,3	17,4	0,6	1,0	8,1	1,5	0,7
3	1,5	13,1	4,0	16,1	6,9	1,1	2,7	1,6	4,6
4	2	13,4	3,9	17,1	1,2	1,1	0,9	1,4	7,1
5	2,5	13,6	7,4	17,0	1,7	1,0	8,1	1,6	0,7
6	22	11,3	10,3	14,9	13,9	0,9	18,9	1,3	15,6
7	23	11,8	6,4	n.d.	n.d.	0,9	17,1	1,5	5,2
8	25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,9	18,9	1,3	18,2
9	26,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,8	25,2	1,4	12,3
	MW	12,8	6,0	16,6	4,0	1,0	11,1	1,5	7,1
	SD	0,9	3,5	0,9	5,0	0,1	8,7	0,1	6,4
	VK %	7,0		5,3		10,5		8,1	

n.d. nicht durchgeführt

Die Variationskoeffizienten liegen bei den Proben, die über Nacht bei Raumtemperatur standen, zwischen 6,85% und 14,53%. Der Durchschnitt der VKs beträgt 9,39%. Bei den Proben, die im Kühlschrank aufbewahrt wurden, ist der VK im Bereich von 5,31% und 10,47%. Der Durchschnitt der VKs beträgt 7,70%.

Abbildung 15: Stabilität Troponin I relative Abweichung zu 100%

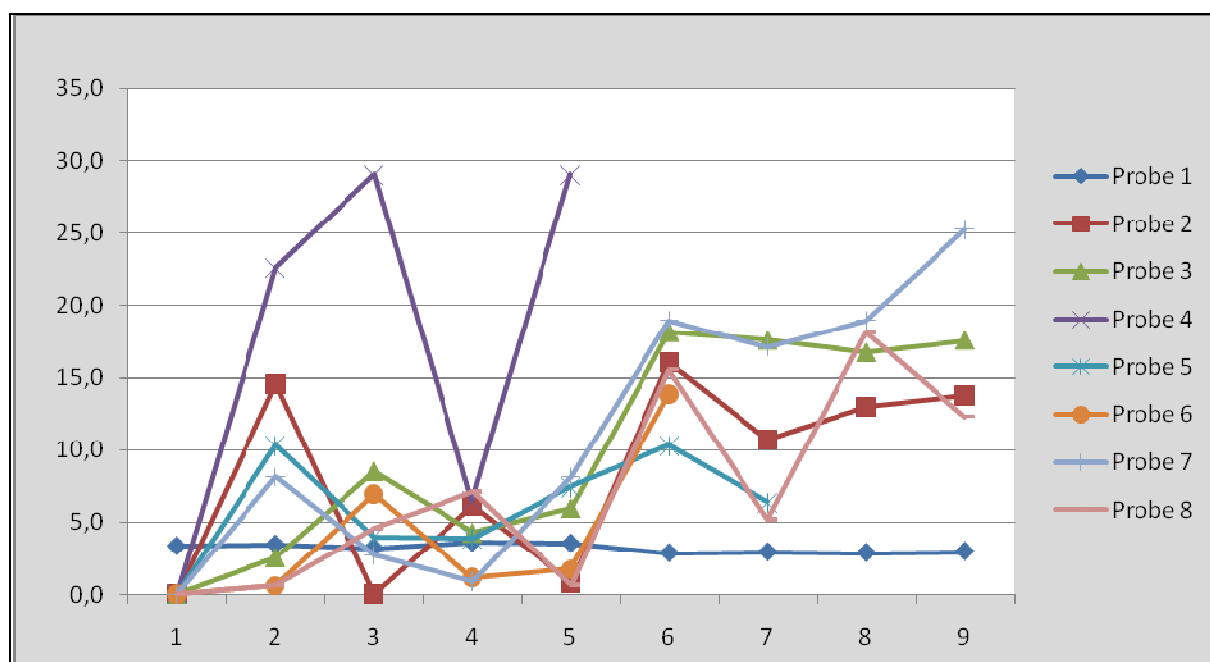


Abbildung 16: Stabilität Troponin I (über Nacht bei Raumtemperatur)

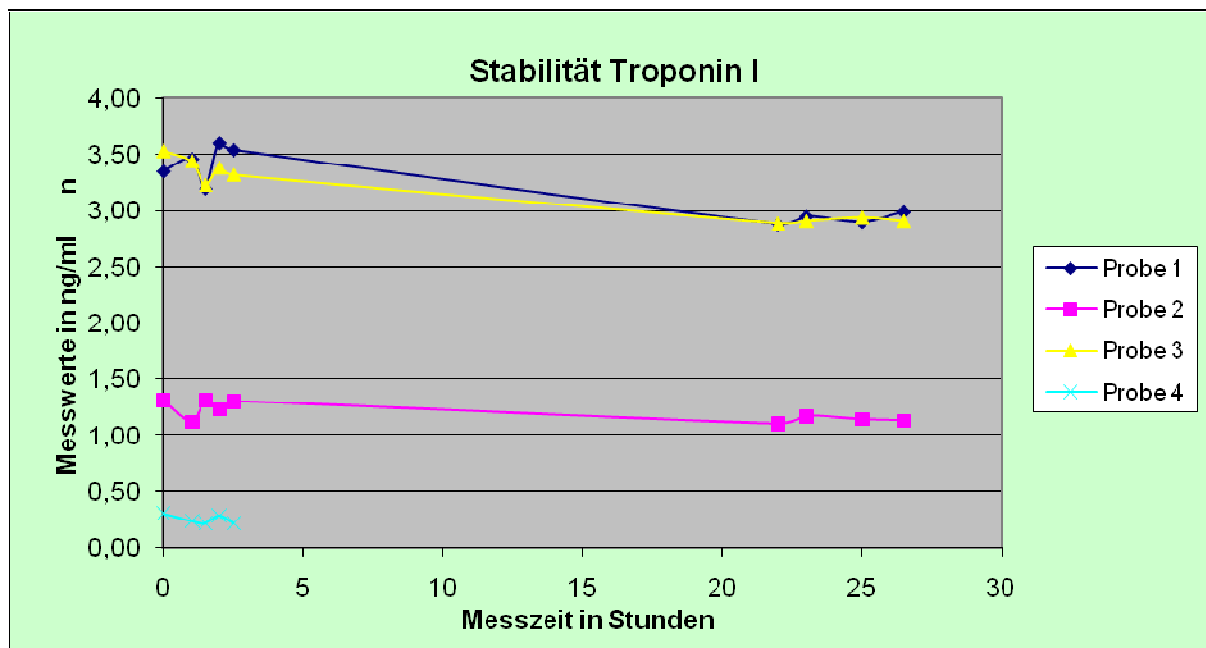
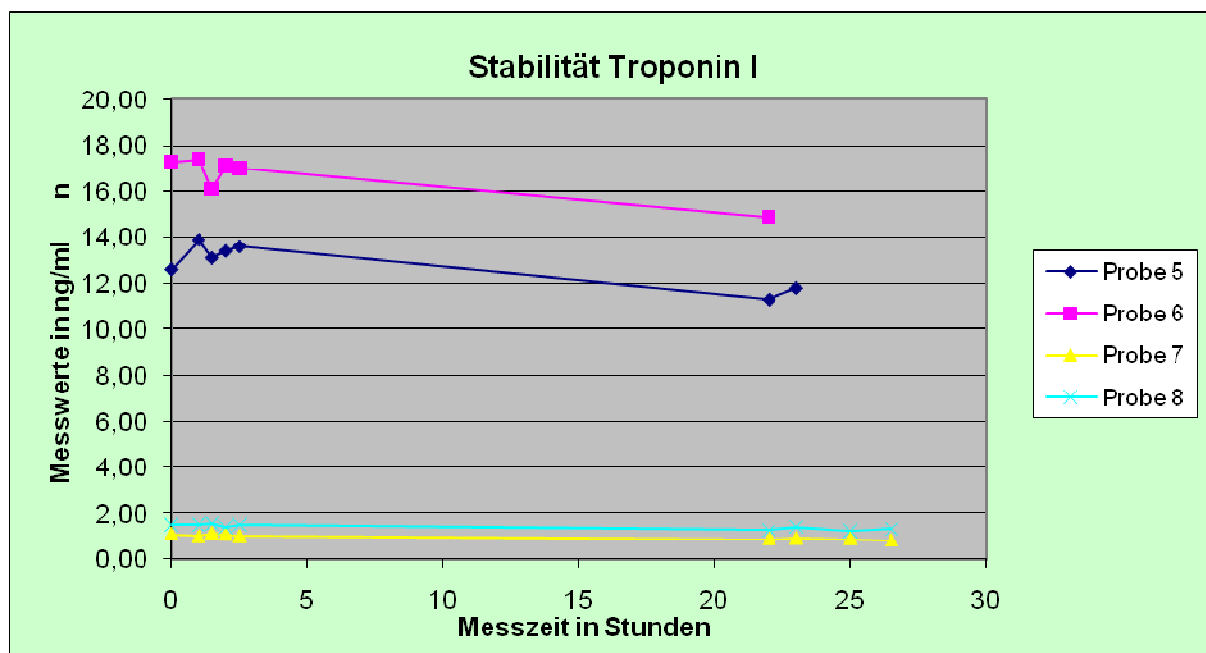


Abbildung 17: Stabilität Troponin I (über Nacht im Kühlschrank 6°C)



3.2 Myoglobin-Studie

3.2.1 Inter- Assay- Präzision

In der Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Inter- Assay- Präzisionsstudie dargestellt. Gemessen wurden vier Patienten mit unterschiedlichen Konzentrationen und zwei Kontrollen. Die Anzahl der Messtage liegt zwischen 11 und 18.

Tabelle 15: Inter- Assay- Präzisionsstudie

Myoglobin	Patienten				Kontrolle	
	ganz niedrig	niedrig	mittel	hoch	Level 1	Level 2
N	13	15	13	11	18	18
Mittelwert in ng/ml	9,6	33,8	304,2	578,8	102,2	274,2
SD in ng/ml	0,7	1,3	19,0	35,7	4,0	15,3
VK in %	6,8	3,9	6,2	6,2	4,0	5,6

Die Variationskoeffizienten liegen zwischen 3,9% bis 6,8%, mit einem Durchschnitt von 5,4%.

3.2.2 Intra- Assay- Präzision

In der Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Intra- Assay- Präzision- Studie aufgelistet. Dabei wurden drei Patientenproben und zwei Kontrolllevel untersucht. Die Fallzahl betrug immer 20.

Tabelle 16: Intra-Assay- Präzision

Myoglobin	Patienten			Kontrolle	
	niedrig	mittel	hoch	Level 1	Level 2
N	20	20	20	20	20
Mittelwert in ng/ml	11,7	302,2	620,0	108,9	292,5
SD in ng/ml	0,4	8,3	19,8	2,1	8,8
VK in %	3,4	2,8	3,2	1,9	3,0

Die Variationskoeffizienten bei dieser Untersuchung befinden sich in dem Bereich von 1,9% bis 3,4%. Der Durchschnitt der Messungen ist 2,8%.

3.2.3 Linearität

In Abbildung 18 und 19 sind die gemessenen Werte der Verdünnungsreihe gegen die berechneten Werte aufgetragen.

Abbildung 18: 1. Verdünnungsreihe von Myoglobin am IMMULITE 2500

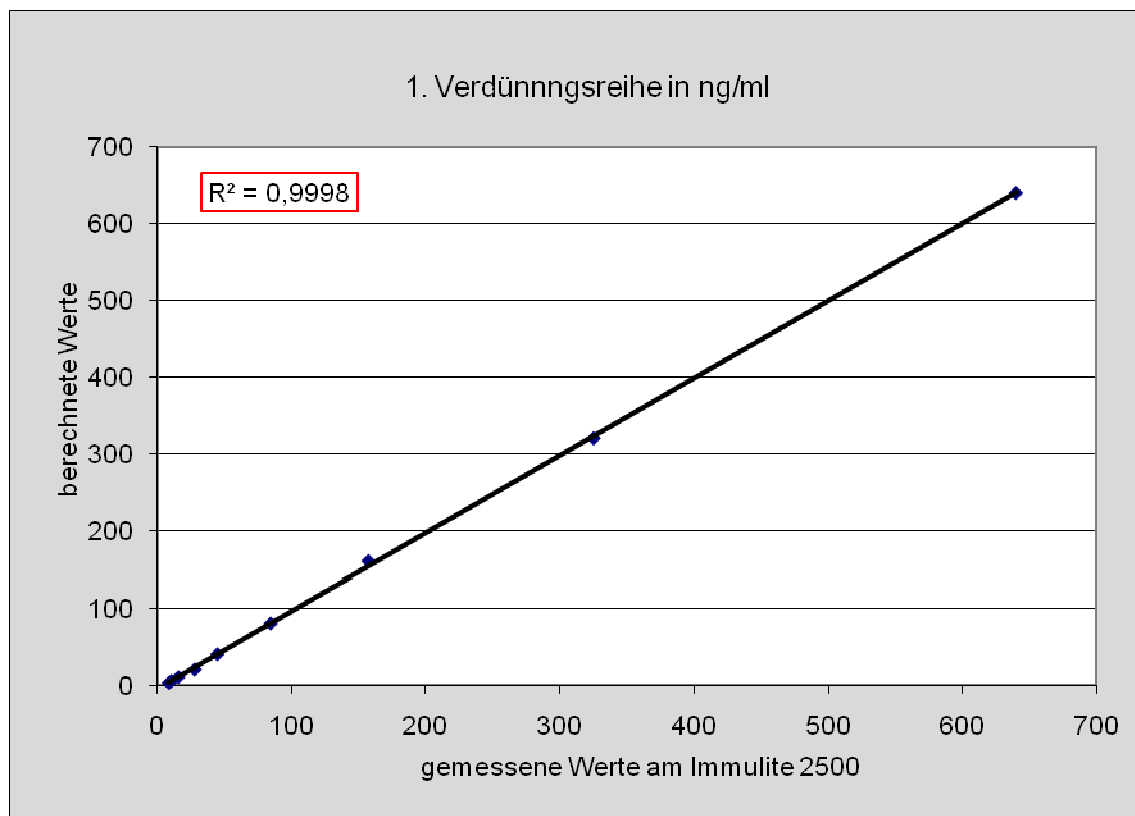
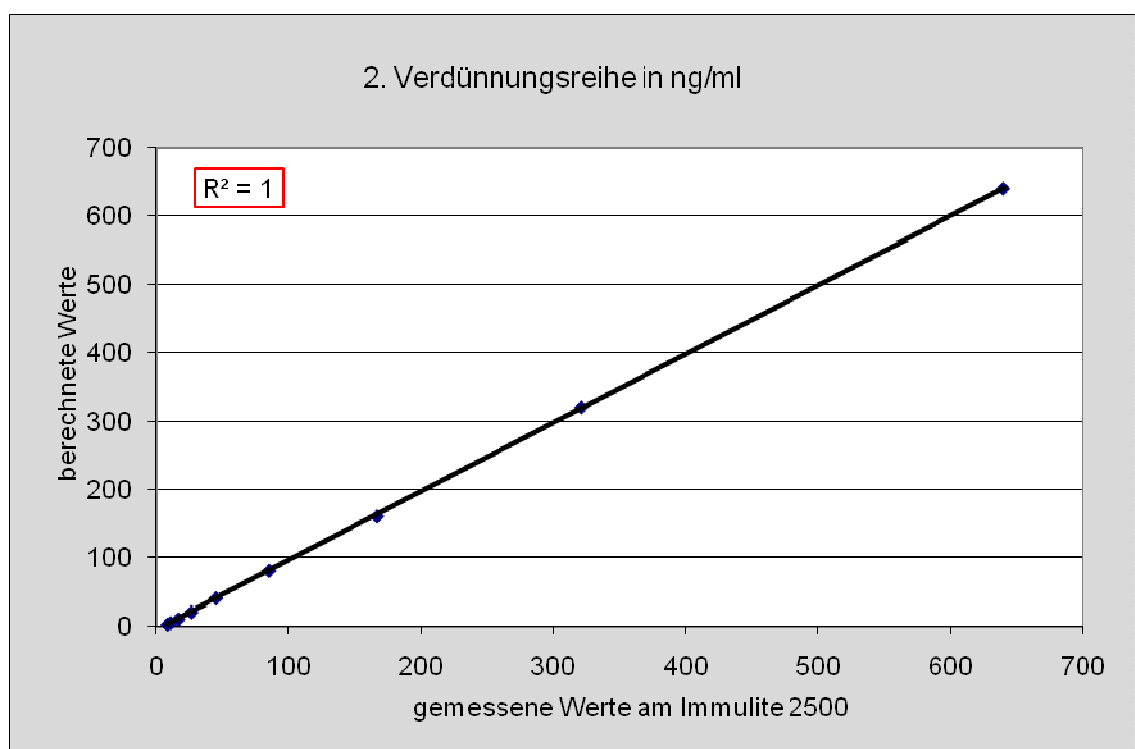


Abbildung 19: 2. Verdünnungsreihe von Myoglobin am IMMULITE 2500



3.2.4 Verschleppung

Die Ergebnisse der Verschleppung werden in der folgenden Tabelle 17 dargestellt, in der der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient festgehalten wurden.

Tabelle 17: Ergebnisse der Verschleppung

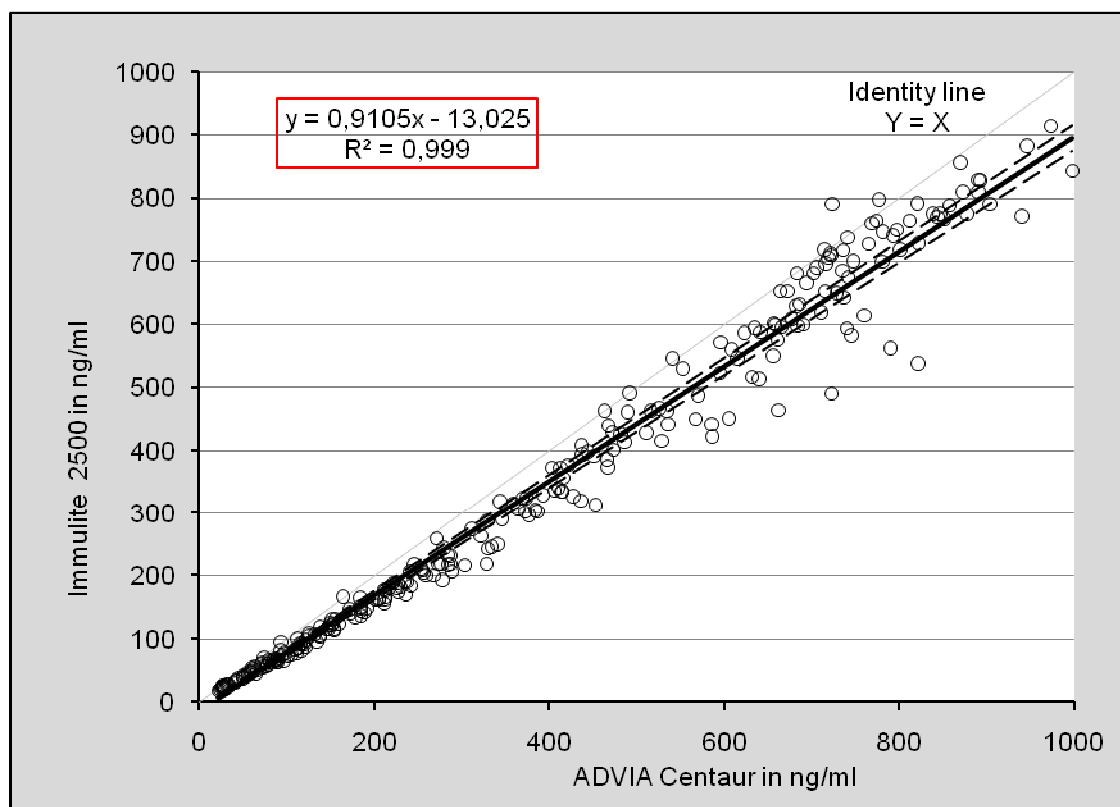
Messung	hohe Probe	niedrige Probe
1	223	13,00
2	219	12,4
3	236	12,5
4	236	13,0
5	235	12,0
6	229	11,7
7	229	12,3
8	229	12,2
9	232	12,0
10	230	12,3
Mittelwert in ng/ml	229,8	12,3
SD in ng/ml	5,2	0,4
VK in %	2,3	3,2

Die Variationskoeffizienten liegen bei der hohen Probe bei 2,28% und bei der niedrigen Probe bei 3,20%. Es liegt keine Beeinflussung der niedrigen Probe vor.

3.2.5 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich für Myoglobin wurde am IMMULITE 2500 und dem ADVIA Centaur durchgeführt. Die Fallzahl betrug $n = 257$ Proben, diese liegen im Messbereich von 15 bis 1000 ng/ml.

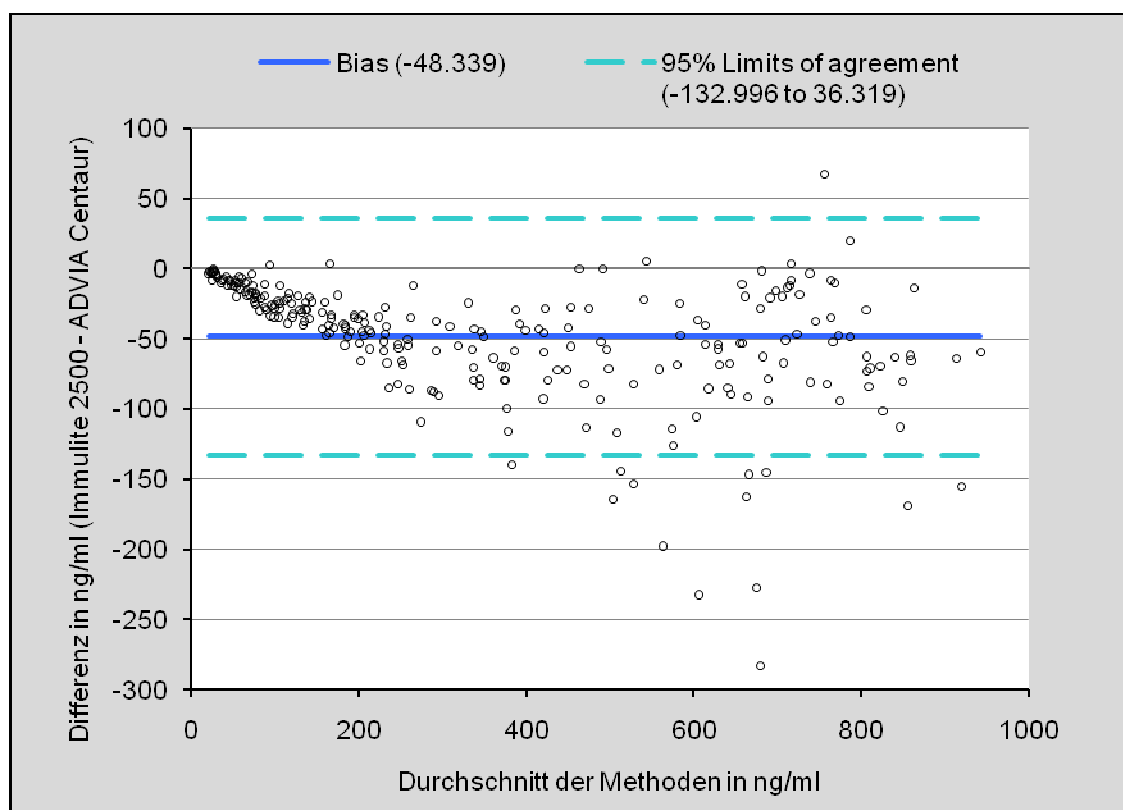
Abbildung 20: Bablok- Passing Myoglobin IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur



Mit einer Regressionsgeradengleichung von $y = 0,9105x - 13,025$ bedeutet dies, dass der IMMULITE 2500 immer niedriger misst als der ADVIA Centaur.

Die beiden Methoden korrelieren gut miteinander. Der Korrelationskoeffizient beträgt $R^2 = 0,999$.

Abbildung 21: Bland- Altman für Myoglobin IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur



Die durchgezogene Linie zeigt die mittlere Differenz (Bias) an. Diese Abweichung ist wie die Abbildung zeigt mit einem Bias von – 44, 339 ins Negative verschoben.

Durch diese nach Bland- Altman berechnete Differenz liegen Messungen mit dem IMMULITE 2500 im Vergleich zum ADVIA Centaur durchschnittlich um – 44,339 ng/ml niedriger.

Der Übereinstimmungsbereich (limits of agreement = LOA) mit 95% Wahrscheinlichkeit errechnet sich aus:

$$\text{LOA1} = \text{Bias} - 2\text{SD} = -48,339 - 84,657 = -132,996$$

$$\text{LOA2} = \text{Bias} + 2\text{SD} = -48,339 + 84,658 = 36,319$$

Die Werte streuen bis auf 14 Ausnahmen im Bereich der zweifachen Standardabweichung (gestrichelte Linien) um diese mittlere Differenz. Das bedeutet, dass ca. 94,6 % der Werte (insgesamt 257 Wertepaare) innerhalb dieser Standardabweichung liegen.

3.3 CK- MB- Studie

3.3.1 Inter- Assay- Präzision

Folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Inter- Präzision- Studie von CK-MB. Die Anzahl der Messtage variiert zwischen 12 und 17 Tagen.

Tabelle 18: Inter- Assay- Präzision

CK-MB	Patienten			Kontrolle	
	niedrig	mittel	hoch	Level 1	Level
N	13	12	12	17	17
Mittelwert in ng/ml	4,1	219,3	416,7	6,2	88,8
SD in ng/ml	0,4	10,6	16,9	0,3	7,8
VK in %	9,1	4,8	4,1	5,2	8,8

Der Messbereich des Variationskoeffizienten liegt zwischen 4,1% und 9,1%. Damit befinden sich alle Werte unter 10%. Der Mittelwert beträgt 6,3%.

3.3.2 Intra- Assay- Präzision

In der Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Intra- Assay- Präzision- Studie dargestellt. Die Fallzahl betrug bei allen fünf Messreihen n= 20.

Tabelle 19: Intra- Assay- Präzision

CK-MB	Patienten			Kontrolle	
	niedrig	mittel	hoch	Level 1	Level 2
N	20	20	20	20	20
Mittelwert in ng/ml	4,7	150,9	412,3	6,4	99,4
SD in ng/ml	0,2	5,8	15,0	0,4	5,2
VK in %	5,0	3,8	3,7	5,8	5,2

Die Variationskoeffizienten der drei Patienten und der beiden Kontrollen haben einen mittleren Wert von 4,7%, wobei die Werte von 3,8% bis 5,8% reichen.

3.3.3 Linearität

In Abbildung 22 und 23 sind die gemessenen Werte der Verdünnungsreihe gegen die berechneten Werte aufgetragen.

Abbildung 22: 1. Verdünnungsreihe von CK-MB am IMMULITE 2500

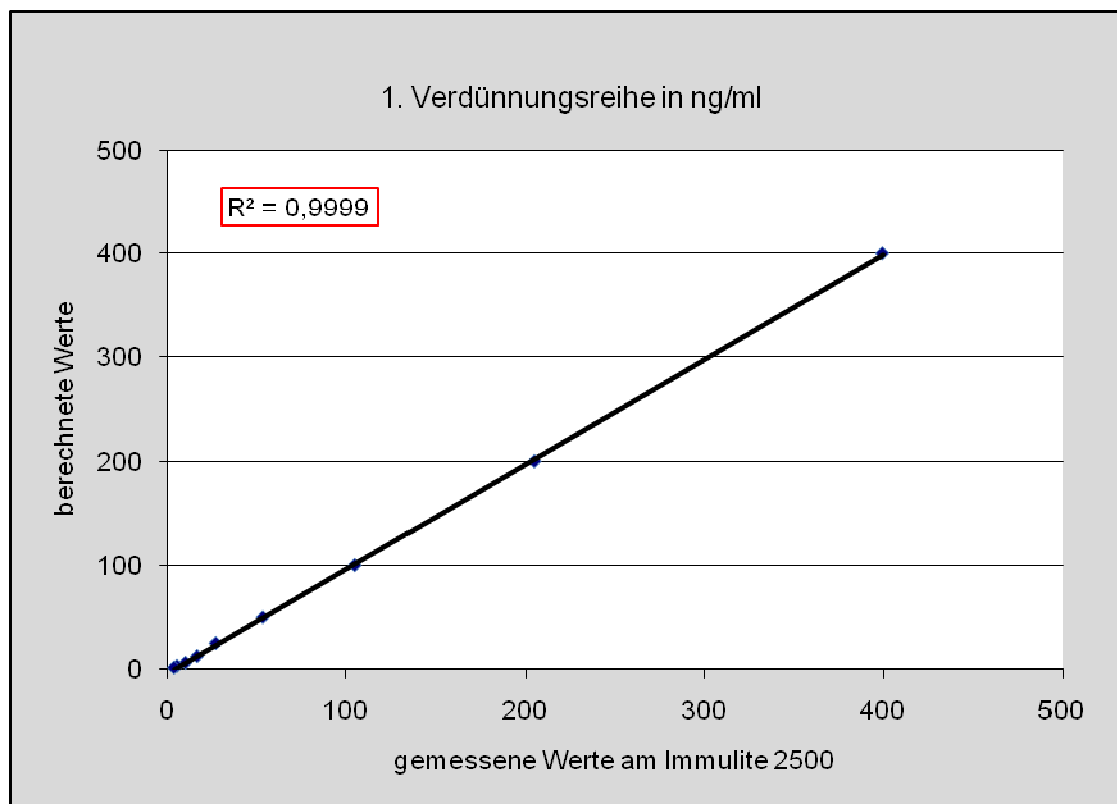
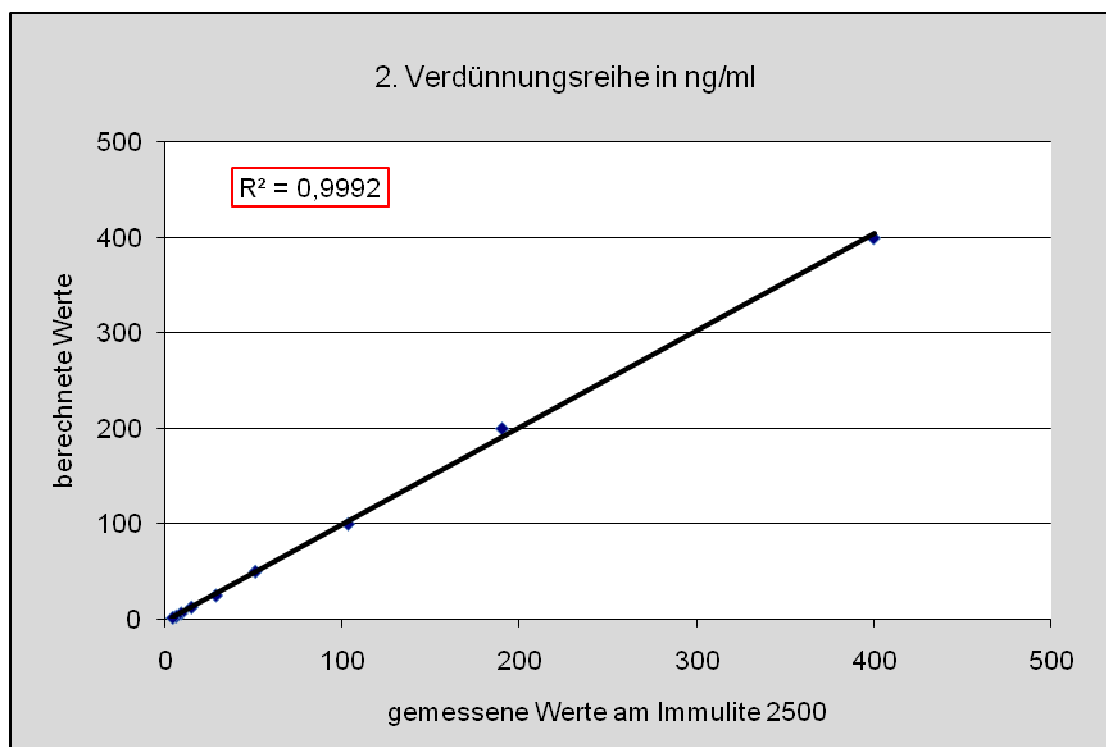


Abbildung 23: 2. Verdünnungsreihe von CK-MB am IMMULITE 2500



3.3.4 Verschleppung

Die Ergebnisse der Verschleppung zeigt die Tabelle 20. Die niedrige Probe wurde durch die jeweils vorausgegangene hohe Probe nicht beeinträchtigt. Es liegt somit also kein systematischer Fehler vor.

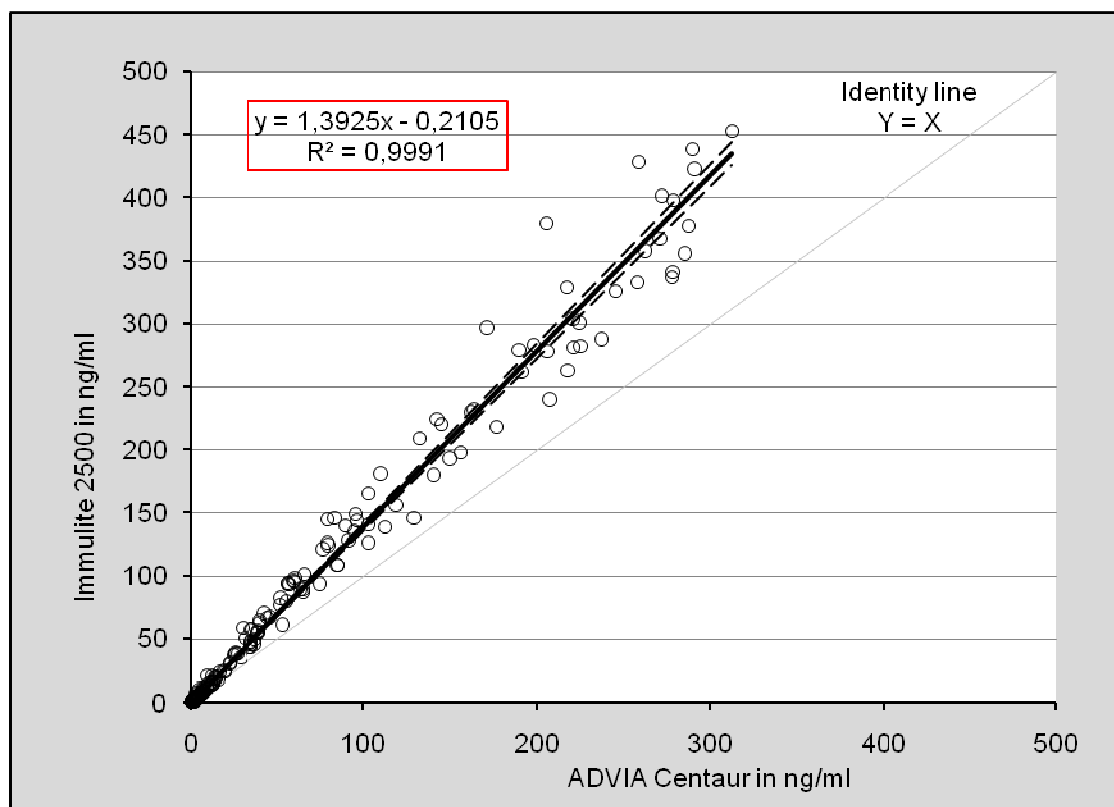
Tabelle 20: Verschleppung CK- MB

Messung	hohe Probe	niedrige Probe
1	139	1,5
2	148	1,4
3	153	1,2
4	155	1,8
5	147	1,2
6	143	1,4
7	142	1,4
8	150	1,6
9	137	1,6
10	143	1,4
Mittelwert in g/ml	145,7	1,5
SD in ng/ml	5,6	0,2
VK in %	3,6	12,2

3.3.5 Methodenvergleich

Die Abbildung 24 zeigt den Methodenvergleich von CK-MB am IMMULITE 2500 und am ADVIA Centaur. Es wurden $n = 224$ Proben gemessen. Der Korrelationskoeffizient beträgt $R^2 = 0,9991$.

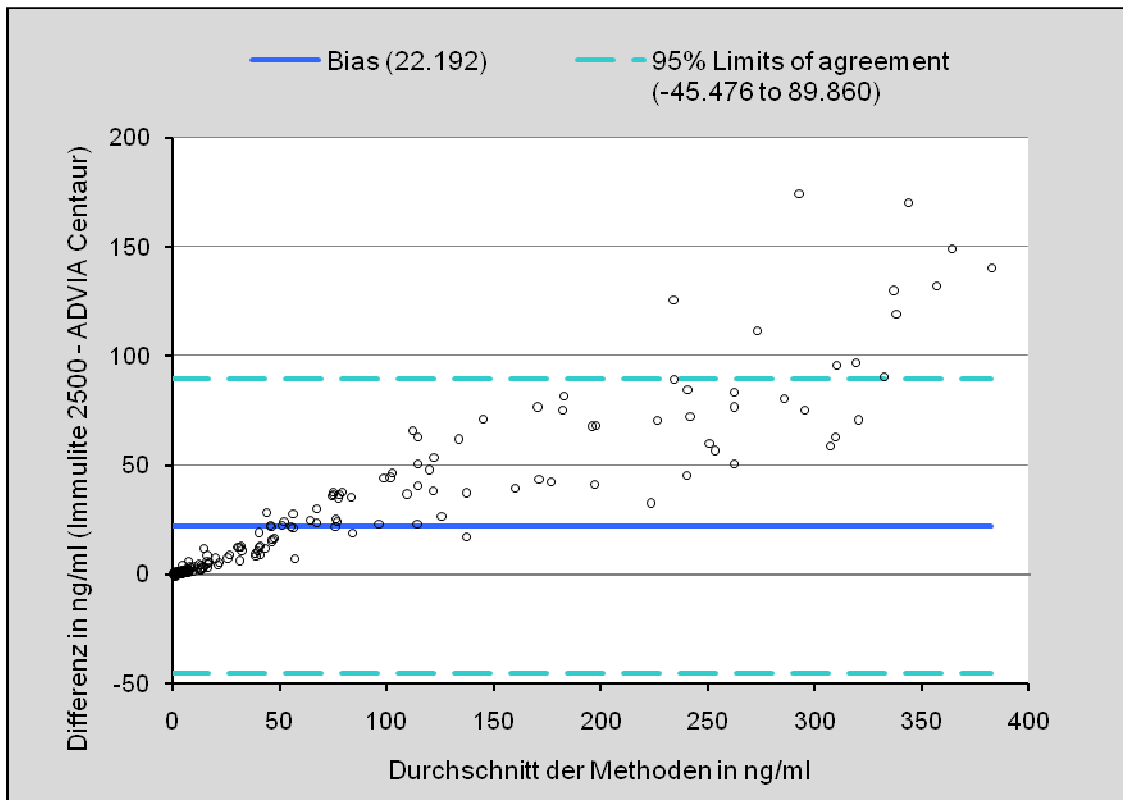
Abbildung 24: Bablok- Passing IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur



Mit einer Regressionsgeradengleichung von $y = 1,3925x - 0,2105$ bedeutet dies, dass der IMMULITE 2500 ab einem Wert von 0,54 ng/ml höher misst als der ADVIA Centaur.

Die beiden Methoden korrelieren gut miteinander. Der Korrelationskoeffizient beträgt $R^2 = 0,999$.

Abbildung 25: Bland- Altman für CK- MB am IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur



Die durchgezogene Linie zeigt die mittlere Differenz (Bias) an. Diese Abweichung ist wie die Abbildung zeigt mit einem Bias von 22,192 ng/ml ins Positive verschoben.

Durch diese nach Bland- Altman berechnete Differenz liegen Messungen mit dem IMMULITE 2500 im Vergleich zum ADVIA Centaur durchschnittlich um 22,192 ng/ml höher.

Weiterhin zeigt sich ein proportionaler Fehler. Diesen erkennt man daran, dass die Abweichung mit höheren Werten zunimmt.

Der Übereinstimmungsbereich (limits of agreement = LOA) mit 95% Wahrscheinlichkeit errechnet sich aus:

$$\text{LOA1} = \text{Bias} - 2\text{SD} = 22,192 - 67,668$$

$$\text{LOA2} = \text{Bias} + 2\text{SD} = 22,192 + 89,860$$

Die Werte streuen bis auf 12 Ausnahmen im Bereich der zweifachen Standardabweichung (gestrichelte Linien) um diese mittlere Differenz. Das bedeutet, dass ca. 94,6 % der Werte (insgesamt 224 Wertepaare) innerhalb dieser Standardabweichung liegen.

4 Diskussion

4.1 Kardiale Marker in der Diagnostik akuter Koronarsyndrome

1979 wurde eine Definition des Herzinfarktes von der Weltgesundheitsorganisation (WHO)⁴ herausgegeben. Eine wichtige Rolle erhielten hier die Biomarker. Die damaligen Marker (GOT/AST, CK) erfüllten die genannten Kriterien (Organspezifität, hohe Sensitivität, schnelle Ergebnisse, längere Verweildauer im Blut) der Biomarker nicht vollständig. Die Forschung, um einen kardiospezifischen Marker zu finden, wurde vorangetrieben. Heute sind Myoglobin, CK-MB und besonders kardiales Troponin I (cTnI) und kardiales Troponin T (cTnT)^{3, 21, 78, 120, 132, 142, 143, 181} als Biomarker bei Myokardzellschäden etabliert^{29, 69, 82, 124}.

Die Testergebnisse der biochemischen Marker sollten im Notfall in weniger als 30 Minuten ausgewertet sein^{29, 33, 103, 114, 180}.

Die kardialen Troponine sind bei gesunden Menschen nicht erhöht. Nach einer Schädigung des Myokards werden cTnI und cTnT nahezu gleich schnell in die Blutbahn freigesetzt. Der Maximalwert wird gleichzeitig erreicht und die Nachweisbarkeit im Blut beträgt vier bis fünf Tage, wobei cTnT länger erhöht bleibt.

In der Sensitivität unterscheiden sich die beiden Parameter kaum. Ein Unterschied zwischen den beiden ist wohl an der Spezifität festzumachen¹⁸⁰. Bei bestimmten Erkrankungen im Erwachsenenalter, chronische Niereninsuffizienz (Kreatinin >2,5 mg/dl) und Skelettmuskelerkrankungen, kann cTnT auch wieder im Skelettmuskel reexprimiert werden^{13, 25, 74, 125, 158}. Eine Erhöhung von cTnI zeigt also eine myokardiale Schädigung an, da es nach Beendigung der fetalen Phase nicht im skelettalen Muskel exprimiert wird.

Die Bedeutung von cTnI wird anhand folgender Studie spanischer Wissenschaftler deutlich. Im Laufe eines Jahres wurden primär gesunde Patienten, die mit retrosternalen Schmerzen ohne EKG-Veränderung und im Normbereich liegenden Herzenzymen (GOT, LDH, CK-MB) ins Krankenhaus kamen, mittels Herzkatheter untersucht. cTnI-Werte größer/gleich 0,4 ng/ml wurden als erhöht eingestuft und mit den Ergebnissen der Koronarangiographie

verglichen. 34 von 37 aufgenommenen Patienten wurden koronarangiographiert. Eine KHK wurde bei 22 diagnostiziert, 15 davon hatten erhöhte cTnI-Werte. Die Sensitivität betrug 68%, die Spezifität 82%. Nach Braunwald und Hamm ist dies der Schweregrad III B der Angina pectoris^{9, 48, 122, 155}.

Die kardialen Parameter CK-MB, Myoglobin und Troponin I machen einen wichtigen Teil der Diagnostik bei akuten myokardialen Schädigungen aus. Aber auch als Verlaufskontrolle, Reinfarktdiagnostik, Prognoseparameter und Kontrolle nach thrombolytischen Therapien sind besonders die kardialen Troponine ein aussagekräftiger Parameter⁹.

4.2 Kardiale Marker bei der Verlaufskontrolle (z.B. nach Lyse, Stenting, Bypass, Transplantation) und der Diagnostik für Myokardschädigung

4.2.1 Lyse, PTCA mit und ohne Stent

Ein weiterer Einsatzort für die kardialen Troponine ist die Verlaufskontrolle nach invasiver Therapie bei KHK. Nach erfolgreicher Intervention mittels einer medikamentösen Thrombolyse oder einer PTCA beim akuten Koronararterienverschluss kommt es zum Anstieg kardialer Enzyme ins venöse Blutssystem¹¹⁰. Dies wird als Washout- Phänomen bezeichnet. Diese nichtinvasive Erfolgskontrolle zeichnet sich durch einen massiven Anstieg der kardialen Enzyme nach einer Therapie aus^{1, 5}. Die Voraussetzung ist ein vollständiger Verschluss eines Gefäßes^{23, 46, 183}.

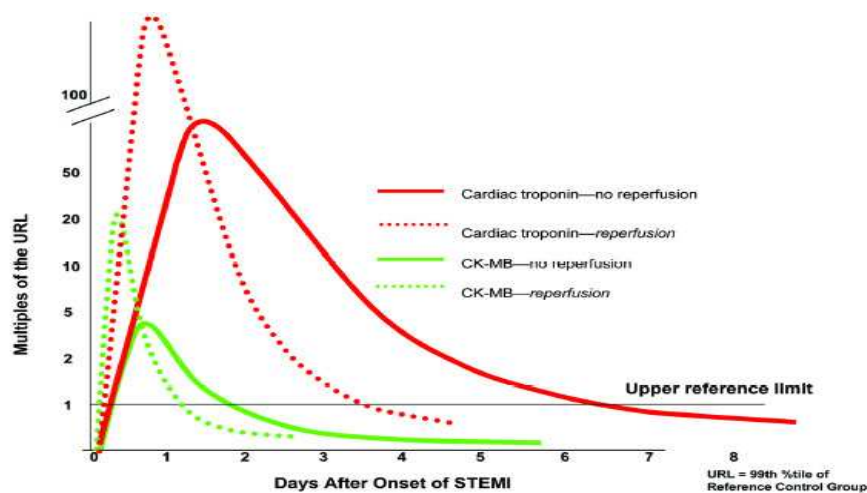
Abbildung 26: Freisetzung der kardialen Enzyme nach AMI und Reperfusion²

Figure 11. Cardiac biomarkers in ST-elevation myocardial infarction (STEMI). Typical cardiac biomarkers that are used to evaluate patients with STEMI include the MB isoenzyme of CK (CK-MB) and cardiac specific troponins. The horizontal line depicts the upper reference limit (URL) for the cardiac biomarker in the clinical chemistry laboratory. The URL is that value representing the 99th percentile of a reference control group without STEMI. The kinetics of release of CK-MB and cardiac troponin in patients who do not undergo reperfusion are shown in the solid green and red curves as multiples of the URL. Note that when patients with STEMI undergo reperfusion, as depicted in the dashed green and red curves, the cardiac biomarkers are detected sooner, rise to a higher peak value, but decline more rapidly, resulting in a smaller area under the curve and limitation of infarct size. Modified with permission from Alpert et al. J Am Coll Cardiol 2000;36:959 (233) and Wu et al. Clin Chem 1999;45:1104 (234).

Anders verhält es sich mit der Erhöhung von Troponin nach elektiver PTCA oder Stent- Implantation, wo bei der Ausgangssituation keine vollständige Okklusion der Koronararterien vorlag und somit keine Myokardnekrose. Diese Erhöhung von Troponin wird wahrscheinlich durch ausgelöste Mikroembolien während der Intervention selbst bedingt. Nach den neuen Kriterien sollte diese Troponinerhöhung als MMD bezeichnet werden. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass dies eine Prognoseverschlechterung, d.h. ein erhöhtes Risiko für Folgeereignisse (wie z.B. Myokardinfarkt) des Patienten bedeutet. Aus diesem Grund sollte vor und nach der Intervention eine Bestimmung der Herzenzyme erfolgen¹⁷.

4.2.2 Herzoperationen

Swaanenburg et al. veröffentlichten 2001 eine Studie, in welcher die Muster der Freisetzung von Herzmarkern (CK- Gesamt, CK-MB- Aktivität, CK-MB- Masse, Troponin T und Troponin I) bei verschiedenen, komplikationslos verlaufenden herzchirurgischen Operationen untersucht wurden¹⁵⁹. Sie konnten zeigen, dass die Muster in Abhängigkeit von der durchgeführten Operation verschieden sind. Die höchsten Troponinspiegel resultierten aus Klappen-Ersatz-OPs, während koronare Bypässe mit Herz-Lungen- Kreislaufumgehung niedrigere Werte zeigten. Koronare Bypässe ohne Herz-Lungen-Kreislaufumgehung zeigten dagegen keine signifikanten Steigerungen der Troponinspiegel.

Der Mechanismus der Herzmuskelschädigung kann bei Herzoperationen vielseitig sein (chirurgische Nähte, operationsbedingter Schaden, globale Ischämie durch inadäquate Perfusion, etc.). Allerdings ist noch kein Biomarker in der Lage, eine ischämisch ausgelöste Herzmuskelnekrose (Herzinfarkt) von intraoperativ beschädigtem Herzmuskel zu unterscheiden. Trotzdem kann das Ausmaß der Markererhöhung zur Quantitätsbeurteilung des Schadens herangezogen werden¹⁷.

Mehrere Arbeitsgruppen haben die Kardioselektivität von cTnI und CK-MB in der frühen Diagnostik der Myokardischämie und/oder des Infarktes nach einer Aortocoronaren-Venen- Bypass- Operation (ACVB- OP) untersucht^{94, 106, 111, 129}. Patienten wurden nach ihrer Operation ohne Berücksichtigung der Parameter nach dem EKG- Befund in 2 Gruppen eingeteilt:

1. Komplikationslose Genesung
2. signifikante ST- Streckenänderung (Myokardischämie bzw. Myokardinfarkt)

Als Ergebnis stellte sich heraus, dass bei keinem der Patienten vor der Operation erhöhte Parameter (cTnI und CK-MB) gemessen wurden. Zwei Stunden nach der Operation waren beide Parameter in beiden Gruppen gleich hoch. Ab der 6. Stunde nach dem Ende der Operation waren beide Parameter bei Patienten mit EKG-Veränderungen signifikant höher (17 ng/dl) als bei Patienten ohne EKG-Veränderungen (3,1 ng/dl).

Binnen der ersten sechs postoperativen Stunden erlauben sowohl die cTnI- als auch die CK-MB-Bestimmungen, zwischen den Patienten mit einem komplikationslosen Verlauf und denen mit einer signifikanten Ischämie zu unterscheiden. Dies ist besonders in Fällen mit nicht eindeutigen EKG-Veränderungen von großem Nutzen^{94, 106}.

4.2.3 Herztransplantation

Nach Herztransplantationen zeigt sich dagegen ein etwas anderes Bild. So kommt es bei allen Patienten nach der OP zu einem Anstieg der kardialen Troponine¹¹². Auch ein Jahr nach Transplantation zeigten laut einer Studie 56% dieser Patienten konstant erhöhte cTnI- Spiegel. Diese cTnI-Erhöhung war mit vermehrten Fibrinablagerungen in Gefäßen und Kardiomyozyten assoziiert.

Gleichzeitig hatten diese Patienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von KHK, sowie ein erhöhtes Risiko für ein Versagen des Herztransplantats. Gleiches konnte auch für das cTnT gezeigt werden⁵².

4.2.4 Kardiomyopathien

In einer Studie wurden Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie untersucht. Gegenstand der Untersuchung war das Auftreten von cTnI und deren klinische Bedeutung. Die Patienten wurden folgenden Test unterzogen:

- Labortests (cTnI, NTproANP und NTproBNP)
- Echokardiographie
- kardiopulmonale Belastungstests
- Single-Photonen-Emissions- CT
- Links- und Rechtsherzkatheter

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, die cTnI- positiv waren ein schlechteres klinisches „Outcome“ haben als cTnI- negative Patienten. Als Langzeitereignis hatten diese Patienten deutlich häufiger einen Herztod, eine Herztransplantation oder eine ICD- Implantation (cTnI+/cTnI-: 37/8 %) ¹²⁷.

4.2.5 Kardiotoxische Wirkung von Chemotherapeutika bei Patienten mit hämatoonkologischer Grunderkrankung

Chemotherapeutika aus der Anthracyclin- Gruppe haben eine kardiotoxische Wirkung. Um die kardiotoxische Nebenwirkung nachzuweisen, wurden in Studien die Verwendung von kardialen TnI, CK-MB und Myoglobin und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) als Verlaufsparemeter untersucht. Die biochemischen Marker CK-MB und Myoglobin und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) lagen bei allen Patienten vor der Therapie im Normbereich. Das cTnI war bei den mit einem Anthracyclin behandelten Patienten signifikant angestiegen und kann somit als sensibler Marker für Myokardschäden angewendet werden. CK-MB und Myoglobin und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) blieben noch im Normbereich¹²⁸. In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass Glycogenphosphorylase- BB (GPBB) ein neuer vielversprechender Marker zur Detektion kardiotoxischer Wirkung von Anthracyclinen sei⁹⁰.

4.2.6 Weitere Erkrankungen

Die kardialen Biomarker zeigen an, ob Herzmuskelzellen nekrotisch werden. Aus diesem Grund können auch alle anderen Zustände, die mit einem Untergang von Herzmuskelzellen assoziiert sind, zu einem Anstieg der kardialen Biomarker führen. Dies gilt in erster Linie für Entzündungen des Myokards¹¹⁵, Traumata oder auch akute Druckbelastungen, wie z.B. bei Patienten mit Lungenembolie⁷².

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die kardialen Troponine spezifische und sensitive Parameter in der Diagnostik von Herzmuskelläsionen darstellen. In erster Linie können sie in der Diagnostik, Risikostratifizierung, Therapieentscheidung⁴⁵ und in der Verlaufskontrolle bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom (ACS) eingesetzt werden. Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind auch die Diagnostik bei anderen Erkrankungen, die mit dem Untergang von Herzmuskelzellen einhergehen. Myoglobin ist ein sehr früher Marker von Herzmuskelschäden, aber seine Spezifität ist eher niedrig. Auch CK-MB ist nicht besonders herzspezifisch und kann bei Hypertension, Linksherzhypertrophie und KHK⁹³, desweiteren auch bei Marathonläufer nach 24 Stunden, bei Hochleistungssportlern nach einer Muskelverletzung^{95, 153} und bei chronischen Myopathien^{97, 107, 154} erhöht sein.

4.3 Analytische Probleme

Durch die Verfügbarkeit verschiedener Tests zur Bestimmung der kardialen Biomarker ist es notwendig, Qualitätsanforderungen und Standardisierungen bei diesen Assays zu definieren und durchzusetzen. Aus diesem Grunde haben europäische und amerikanische Fachgesellschaften das „IFCC Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage“ gegründet und 1999 entsprechende Empfehlungen herausgegeben. Voraussetzungen für die klinische Anwendung der automatisierten Assays sind:

- hohe Sensitivität und Spezifität
- analytische Genauigkeit
- Schnelligkeit und einfache Durchführung

Die von der International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine angesprochene Anforderungen bei der Diagnostik mittels Herzmarkern beinhalten folgende Punkte¹³⁵

Tab. 1 des angegebenen Artikels

- Analytische Herausforderungen
 - Standardisierung der Tests
 - Präzision der Tests
 - Präanalytische Variabilität
- Zeitdauer bis zum Eintreffen des Messergebnisses
 - Schnelligkeit des Assays
 - Verfügbarkeit des Assays
- Wirtschaftliche Aspekte (Kosten- Nutzen- Verhältnis)
- Richtlinien (diagnostische Goldstandards)
- Prognostische Implikation

Standardisierung der Tests

Eine ideale Standardisierung der kardialen Tests würde bedeuten, dass die gleiche Probe bei jedem auf dem Markt vorhandenen Assay annähernd identische Ergebnisse der Konzentration liefert. Die verfügbaren Immunoassays benutzen aber Antikörper, die gegen verschiedene Epitope der respektiven Antigene gerichtet sind.

Eine Studie aus dem Jahr 2004 zur Standardisierung von Myoglobin-Immunoassays verschaffte eine Basis, um eine international anerkannte Referenzmethode zu entwickeln. Die Messabweichung zwischen den einzelnen Myoglobin- Assays konnte so von 32% auf 13% reduziert werden¹³⁷.

Mit der Entwicklung eines CK-MB Standards konnte die systematische Messabweichung zwischen den einzelnen Messmethoden von 40% auf 12% reduziert werden. Als Referenzmethode zur Standardisierung der CK- MB-mass- Assays wird das lyophilisierte rekombinante CK- MB2 (lyophilisiertes rCK- MB2) verwendet⁴⁷.

Ein Problem bei cTnI ist, dass die einzelnen Hersteller unterschiedliche Antikörper benutzen, die gegen verschiedene Epitope und Formen des cTnI gerichtet sind. cTnI kann sowohl als freies cTnI in oxidiert und reduzierter Form⁴¹ als auch als cTnI-C-Komplex, oder cTnT-I-C- Komplex im Blut vorkommen. Desweiteren kommt es durch die unterschiedliche Phosphorylierung in verschiedenen Formen vor (s. 1.2 Troponin I)³². Eine weitere Schwierigkeit ist, dass die einzelnen Tests gegen unterschiedliche Standards kalibriert sind¹³⁶.

Aus diesem Grund ergeben die verschiedenen cTnI Assays teilweise sehr weit auseinanderliegende Ergebnisse, die einen direkten Vergleich der Messwerte beinahe unmöglich machen. Um diese Probleme zu lösen, wurden folgende Forderungen aufgestellt¹³⁵.

Forderungen an die Hersteller

- Antikörper sollten sowohl gereinigtes isoliertes cTnI als auch den cTnI-cTnT und cTnI-cTnC -Komplex äquimolar erkennen
- Auch oxidierte und reduzierte Formen des cTnI sollten erkannt werden
- Ebenfalls sollten phosphorylierte Formen des cTnI durch die verwendeten Antikörper erkannt werden.

Die internationalen Verbände und Organisationen arbeiten derzeit weiter an der Standardisierung der cTnI- Assays. Der große Unterschied in der Antiköperspezifität unter den einzelnen Assays muss minimiert werden. Die

Antikörper sollen an die stabile Region des N- terminalen Endes binden, diese Region befindet sich zwischen den Epitopen 30- 110^{102, 152}. Der Antikörper des cTnl STAT des IMMULITE 2500 ist gegen die Epitope 24-40 und 80- 110 der herzspezifischen N- terminalen Region des Troponinmoleküls gerichtet⁹⁸.

Die Hauptvoraussetzung zur Standardisierung ist, eine geeignete Referenzmethode zu finden¹³⁶. Das Subkomitee der "American Association for Clinical Chemistry" (AACC) in Kollaboration mit der "National Institute of Standards and Technology" (NIST) hat ein primäres Referenzmaterial (SRM2921) entwickelt^{22, 163}.

Aber auch das SRM 2921 ist noch nicht für eine Standardisierung und damit für die Vergleichbarkeit der einzelnen Methoden untereinander ausreichend^{6, 44}.

Obwohl mit diesem Referenzmaterial versucht wurde, die wichtige Form von cTnl nachzuahmen, sind die Analyte in der Referenzmethode und im Patientenblut nicht identisch¹³⁶. Die Entwicklung eines geeigneten Standards wird also noch weiter gehen.

Um eine gewisse Vergleichbarkeit unter den zur Verfügung stehenden Tests zu erzielen wurde der Cut- Off- Wert eingeführt. Dieser soll dort liegen, wo ein CV = 10% so nah wie möglich bei der 99. Perzentile besteht^{17, 19, 24, 37, 60}.

Durch diese Festlegung des einheitlichen Grenzwertes für die kardialen Biomarker wurde ein weiterer Anstieg der Myokardinfarktdiagnosen erzielt¹⁹.

4.4 Methodenevaluierung am IMMULITE 2500

4.4.1 Kardiales Troponin I

4.4.1.1 Inter- Assay- Präzision

Bei den Patientenproben im niedrigen und hohen Bereich lagen die Variationskoeffizienten bei 8,26% und 4,97%. Der VK der mittleren Probe lag mit 10,31% nur knapp darüber. Die Kontrollen lagen bei 9,78% bei der niedrigen Kontrolle und 5,65% bei der hohen Kontrolle.

4.4.1.2 Intra- Assay- Präzision

Sowohl die Werte der Intra-Assay-Präzision der Kontrollen als auch die der Patientenseren zeigten sich in einem Bereich von 3,31% bis 5,31% niedrig.

4.4.1.3 Linearität

Die Verdünnung eines Serums mit der Anfangskonzentration von 91,00 ng/ml zeigte in beiden Versuchen bis zu einer Verdünnung von 1:16 eine gute Linearität mit Werten für die relative Abweichung zu 100% zwischen 3,52% und 13,03%.

Die lineare Regression beträgt bei dem 1. Versuch $R^2 = 0,9985$ und im 2. Versuch $R^2 = 0,9978$.

4.4.1.4 Verschleppung

Bei diesem Versuch konnte keine Verschleppung beobachtet werden. Die Ausgangskonzentration der niedrigen Konzentration betrug 0,72 ng/ml und die Endkonzentration 0,73 ng/ml. Die Ausgangskonzentration der hohen Konzentration betrug 83,5 ng/ml und die Endkonzentration 75,7 ng/ml. Gute Werte zeigten sich auch bei den Variationskoeffizienten. Der VK lag bei der hohen Probe bei 4,24% und bei der niedrigen Probe bei 5,11%. Die Pipettiervorgänge des IMMULITE 2500 gehen demzufolge nicht mit einer Verschleppung der hohen in die niedrige oder umgekehrt der niedrigen in die hohe Probe einher.

Bei der Intra-Assay-Präzision wurde bei einer Konzentration von Mittelwert 1,01 ng/ml ein VK von 4,63% erzielt. Dieser Wert ist ähnlich dem Wert der niedrigen Probe zum Nachweis der Verschleppung.

4.4.1.5 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich zwischen den IMMULITE 2500 und IMMULITE Turbo zeigte im Messbereich bis 100 ng/ml einen sehr guten Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,9988$. Die Messwerte des IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur im selben Messbereich korrelieren gut miteinander ($R^2 = 0,9948$).

Der IMMULITE 2500 misst bis 0,89 ng/ml höher als der IMMULITE Turbo, ab dem Messwert von 0,89 ng/ml misst der IMMULITE 2500 niedriger als der IMMULITE Turbo. Dies bedeutet, dass häufiger eine Intervention erfolgen würde.

Nach der Auswertung von Bland-Altman misst der IMMULITE 2500 im Vergleich zum IMMULITE Turbo eher niedriger und im Vergleich zum ADVIA Centaur eher höher.

4.4.1.6 Stabilität

Bei der Untersuchung der Stabilität in Abhängigkeit von der Zeit und der Lagerung ergab sich bei der Lagerung bei Raumtemperatur über Nacht ein durchschnittlicher VK von 9,39%. Der durchschnittliche VK bei der Lagerung im Kühlschrank bei 6° C über Nacht betrug 7,70%. Es zeigte sich kein relevanter Abfall.

Bei der Kurzzeitstabilität über 26 Stunden und unter unterschiedlichen Lagerungsbedingungen demonstrierten sich somit gute Ergebnisse. Dies ist ein Indiz für eine gute in- vitro Stabilität.

4.4.2 Myoglobin

4.4.2.1 Inter- Assay- Präzision

Sowohl die Werte der Inter- Assay- Präzision der Kontrollen als auch die der Patientenserien zeigten sich in einem Bereich von 3,88% bis 6,78% niedrig.

4.4.2.2 Intra- Assay- Präzision

Die Variationskoeffizienten bei der Intra- Assay- Präzision lagen in dem Bereich zwischen 1,93% bis 3,35%.

4.4.2.3 Linearität

Ein Serum mit einer Anfangskonzentration von 640 ng/ml wurde zweimal gemessen. Der IMMULITE 2500 zeigt eine gute Linearität mit Werten für die relative Abweichung zu 100 % im Bereich von 0,3% bis 13,8%.

Die durchschnittliche Abweichung zu 100% beträgt für die erste Versuchsreihe 3,92% und für die zweite 5%.

Die lineare Regression beträgt bei dem ersten Versuch $R^2 = 0,9998$ und bei dem zweiten Versuch $R^2 = 1$.

4.4.2.4 Verschleppung

Die Ausgangskonzentration der niedrigen Probe lag bei 13,00 ng/ml und die Endkonzentration bei 12,30 ng/ml. Der Mittelwert betrug 12,34 ng/ml. Die hohe Probe hatte eine Ausgangskonzentration von 223,00 ng/ml und eine Endkonzentration von 230,00 ng/ml. Der Mittelwert lag bei 229,80 ng/ml.

Die Variationskoeffizienten liegen bei der hohen Probe bei 2,28% und bei der niedrigen Probe bei 3,20%.

Es kam zu keiner Verunreinigung der niedrigen Probe. Die Pippetiernadel wird zwischen den einzelnen Pippetierschritten effektiv gereinigt.

4.4.2.5 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich zwischen den IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur zeigte im Messbereich bis 1000 ng/ml einen sehr guten Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0,999$.

Die beiden Methoden sind also gut miteinander vergleichbar.

Bei der Untersuchung nach Bland-Altman erkennt man, dass der IMMULITE 2500 immer niedriger misst als der ADVIA Centaur. Bis ca. 250 ng/ml liegt ein proportionaler Fehler vor, danach zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den beiden Messmethoden.

4.4.3 CK-MB

4.4.3.1 Inter- Assay- Präzision

Der Messbereich des Variationskoeffizienten liegt zwischen 4,07% und 9,06% bei den Patientenseren und bei den Kontrollen zwischen 5,22% und 8,75%. Damit befinden sich alle Werte unter dem geforderten VK von 10%. Wie bereits unter 4.3 *Standardisierung der Tests* erwähnt, gibt es seit ca. 1999 einen CK-MB Standard (lyophilisierte rCK-MB2)⁴⁷.

4.4.3.2 Intra- Assay- Präzision

Die Variationskoeffizienten der drei Patienten und der beiden Kontrollen nehmen Werte von 3,82% bis zu 5,79% ein. Erwartungsgemäß lagen auch hier die höheren VKs bei den niedrigeren Proben.

4.4.3.3 Linearität

Die Werte für die relative Abweichung zu 100% liegen zwischen 0,10% bis 13,00%. Die durchschnittliche Abweichung zu 100% liegt bei der ersten Verdünnungsreihe bei 4,58% und bei der zweiten bei 4,26%.

Die lineare Regression beträgt bei dem ersten Versuch $R^2 = 0,999$ und bei dem zweiten Versuch $R^2 = 0,9992$.

4.4.3.4 Verschleppung

Die Ausgangskonzentration der niedrigen Probe lag bei 1,51 ng/ml und die Endkonzentration bei 1,38 ng/ml. Der Mittelwert betrug 1,46 ng/ml. Die hohe Probe hatte eine Ausgangskonzentration von 139,00 ng/ml und eine Endkonzentration von 143,00 ng/ml. Der Mittelwert lag bei 145,70 ng/ml.

Die Variationskoeffizienten liegen bei der niedrigen Probe bei 12,24% und bei der hohen Probe bei 3,85%.

Die niedrige Probe hatte eine sehr niedrige Konzentration, aus diesem Grund ist der VK etwas höher ausgefallen. Die niedrige Probe wurde durch die hohe Probe nicht beeinflusst.

4.4.3.5 Methodenvergleich

Es wurde der IMMULITE 2500 mit dem ADVIA Centaur verglichen.

Die beiden Methoden der einzelnen Messgeräte zeigte nach der Auswertung nach Bablok- Passing einen sehr guten Korrelationskoeffizienten von $R^2=0,9991$.

Die beiden Methoden zur Bestimmung von CK- MB sind gut miteinander vergleichbar.

Bei der Untersuchung nach Bland- Altman erkennt man, dass der IMMULITE 2500 immer höher misst als der ADVIA Centaur. Weiterhin zeigt sich ein proportionaler Fehler.

5 Zusammenfassung

Pathophysiologie

Die wichtigste Ursache der koronaren Herzkrankheit ist die Koronarsklerose, die Folge ist eine Ischämie. Die Folgen einer Ischämie sind von der Schwere und der Zeitspanne der Okklusion abhängig. Es kann zu einer unterschiedlichen Ausprägung kommen von asymptomatisch über eine Einschränkung der biomechanischen und elektrischen Funktion des Herzens, einer Beeinträchtigung der Muskelfunktion bis zum Absterben der Myozyten und zur Nekrose und damit zu dem Vollbild eines akuten Myokardinfarktes.

Biomarker bei ACS

Kardiale Biomarker für das akute Koronarsyndrom sind CK-MB, Myoglobin und Troponin. Nach den Kriterien der WHO wird eine hohe Sensitivität innerhalb der ersten Stunden, eine Myokardspezifität und eine Erhöhung der Biomarker für einige Tage nach dem kardialen Ereignis gefordert, um so Läsionen nachweisen zu können, die schon ein paar Tage zuvor abgelaufen sind.

Die CK-MB, ein Isoenzym der Kreatinkinase, hat zwar eine hohe Myokardspezifität, kann aber auch bei Skelettmuskelschädigungen, Traumata oder nach Operationen erhöht sein.

Diese Unspezifität gilt auch für das Myoglobin, welches ubiquitär im Muskelgewebe vorhanden ist, und bei Muskelerkrankungen und häufig auch bei Nierenerkrankungen erhöht ist. Ein Vorteil des Myoglobins ist aber, dass es als Frühmarker und für die Reinfarktdiagnostik eines MI eingesetzt werden kann.

Das kardiale Troponin ist ein Marker, der vier bis sechs Stunden nach dem kardialen Ereignis freigesetzt wird. Im Laufe der Entwicklung konnten monoklonale Antikörper gegen cTnI und cTnT hergestellt werden, die Troponin als herzspezifischen Biomarker für kardiale Ereignisse in die Diagnosefindung etablierten.

Cut off

Die neue diagnostische Entscheidungsgrenze für das Troponin I ist als das 99. Perzentil einer gesunden Referenzpopulation definiert, sofern bei diesem Wert im Rahmen der totalen Präzisionsbestimmung ein VK < 10% vorliegt. Da es bisher jedoch keinen Hersteller gibt, der diesen Anforderungen gerecht wird, soll der Cut-Off Wert dort liegen, wo ein VK = 10% so nah wie möglich bei der 99. Perzentile besteht.

Referenzmaterial

Ein Problem bei der Bestimmung der kardialen Marker ist die Standardisierung der Tests. Unterschiedliche Hersteller haben Antikörper gegen unterschiedliche Epitope der einzelnen kardialen Marker entwickelt. Durch eine Studie von 2004 zur Standardisierung von Myoglobin- Immunoassays konnte eine Basis zur Entwicklung einer Referenzmethode geschaffen werden. Mit der Entwicklung eines CK-MB Standards, dem lyophilisierten rekombinanten CK- MB2 (lyophilisiertes rCK- MB2) im Jahre 1999 konnte die systematische Messabweichung zwischen den einzelnen Messmethoden von 40% auf 12% reduziert werden.

Für cTnI wurde festgelegt, dass die Antikörper an die stabile Region (Epitop 30-110) des N- terminalen Endes binden sollen. Das Subkomitee der "American Association for Clinical Chemistry" (AACC) hat in Kollaboration mit der "National Institute of Standards and Technology" (NIST) ein primäres Referenzmaterial (SRM2921) entwickelt. Aber auch das SRM2921 ist noch nicht für eine Standardisierung und damit für die Vergleichbarkeit der einzelnen Methoden untereinander ausreichend. Die Entwicklung eines geeigneten Standards wird also noch weiter gehen.

Instabile Angina pectoris, NSTEMI und STEMI

Die instabile Angina pectoris wird als Brustschmerzen mit einem von drei Charakteristika definiert: 1. Sie tritt in Ruhe (oder bei minimaler Anstrengung) auf und hält üblicherweise über zehn Minuten an, 2. Sie ist von großer Intensität und neu aufgetreten (z.B. innerhalb der letzten 4- 6 Wochen), und/oder tritt in zunehmender Intensität auf.

Die Diagnose eines Myokardinfarktes ohne ST- Elevation (NSTEMI) ist gesichert, wenn der Patient mit einer instabilen AP Zeichen einer myokardialen Nekrose aufweist, die durch erhöhte kardiale Biomarker angezeigt werden. Dabei zeigt sich keine ST- Streckenhebung im EKG.

Ein ST- Elevations- Myokardinfarkt (STEMI) ist gekennzeichnet durch einen anhaltenden Brustschmerz, eine persistierende ST- Streckenhebungen (oder einem gesicherten neuen LSB). Es handelt sich um einen akuten Koronararterienverschluss. Das Behandlungsziel ist eine rasche, vollständige und anhaltende Rekanalisation des Gefäßes durch eine direkte perkutane koronare Intervention (PCI/PTCA) oder durch Thrombolyse, falls diese nicht kontraindiziert ist.

Evaluierung von Troponin I-, CK- MB- und Myoglobinassay am IMMULITE 2500

In der vorliegenden Arbeit wurden die IMMULITE 2500 Troponin I-, Myoglobin- und CK-MB- Assays evaluiert. Diese Chemilumineszenz- Assays arbeiten nach dem nicht- kompetitiven Sandwich- Prinzip.

Die analytische Evaluierung des IMMULITE 2500 Troponin I- Assays ergab Variationskoeffizienten zwischen 5,0% und 10,3% (0,8 - 93,4 ng/ml) für die Inter-Assay-Präzision bzw. 3,3% bis 5,3% (0,8 – 90,9 ng/ml) für die Intra-Assay-Präzision. Für Myoglobin wurden Variationskoeffizienten für die Inter-Assay-Präzision zwischen 3,9% und 6,8% (9,6 – 578,8 ng/ml) und für CK-MB zwischen 4,1% und 9,1% (4,1- 416,7 ng/ml). Bei der Intra- Assay-Präzision ergaben sich folgende Ergebnisse: Myoglobin 1,9% bis 3,4% (11,7 – 620,0 ng/ml) und CK-MB 3,8% bis 5,8% (4,7 – 412,3 ng/ml).

Bei der Bestimmung der Verdünnungslinearität ergab sich für Troponin bei der ersten Verdünnungsreihe ein Variationskoeffizient von 1,5% und bei der zweiten von 5,1%. Für Myoglobin für die erste 3,9% und 5,0% für die zweite. Bei CK-MB liegt der Wert für die erste Versuchsreihe bei 4,6% und bei der zweiten bei 4,3%.

Hohe Konzentrationen der einzelnen Parameter wurden abwechselnd mit niedrigen Konzentrationen gemessen. Es wurde bei allen drei Parametern kein

Anstieg der niedrig konzentrierten Probe gemessen und somit der Nachweis erbracht, dass keine Verschleppung durch das Gerät erfolgt.

Der Methodenvergleich für den Troponin-I-Assay wurde an drei verschiedenen Geräten durchgeführt. Der Messbereich lag zwischen 0,2 ng/ml und 97,2 ng/ml. Im Vergleich mit dem IMMULITE Turbo liegt der Korrelationskoeffizient bei $R=0,9988$ und im Vergleich mit dem ADVIA Centaur bei $R=0,9948$. Nach der Auswertung von Bland-Altman misst der IMMULITE 2500 im Vergleich zum IMMULITE Turbo eher niedriger, die mittlere Differenz (Bias) liegt bei $-1,1$ ng/ml und im Vergleich zum ADVIA Centaur eher höher, der Bias liegt bei $4,1$ ng/ml.

Der Methodenvergleich für den Myoglobin- Assay und den CK-MB-Assay wurde mit dem ADVIA Centaur durchgeführt. Hier zeigte sich eine sehr gute Vergleichbarkeit der Methoden mit $R=0,999$ bei Myoglobin und $R=0,9991$ bei CK-MB. Für die Auswertung nach Bland-Altman zeigt sich, dass der IMMULITE 2500 bei Myoglobin immer niedriger misst, der Bias ist ins Negative verschoben bei $-44,4$ ng/ml und bei CK-MB immer höher misst, der Bias liegt bei $22,2$ ng/ml. Weiterhin zeigt sich ein proportionaler Fehler.

Für den Troponin I- Assay wurde die Stabilität bei verschiedenen Lagerungsbedingungen (über Nacht bei Raumtemperatur und über Nacht bei ca. 6°C) über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen. Es zeigte sich keine relevante Änderung der Ergebnisse.

Insgesamt zeigen die untersuchten Assays der kardialen Marker am IMMULITE 2500 eine hohe Präzision und Verdünnungslinearität, keine Probenverschleppung und sind mit den bisherigen auf dem Markt befindlichen Methoden vergleichbar. Durch die schnelle und präzise Analytik sind sie für den Gebrauch in der täglichen Routine und speziell für Notfälle sehr gut einsetzbar.

6 Abstract

The **IMMULITE 2500** (Diagnostic Products Corporation, USA) is a new immunoassay analyzer with Logic Driven Incubation (LDI) capability for easy incorporation of STAT assays. The IMMULITE 2500 has two incubator tracks that shuttle STAT samples for priority processing, with a time-to-first-result of 15 minutes (incubation time of 10 min) for Myoglobin, CK-MB and Troponin.

Within-run imprecision (n=20, patient samples) was determined for 3 different concentrations (cut-off, elevated and high) for all three analytes. In addition within-run imprecision (n=20) was also determined for the specified control materials. The coefficients of variation (CVs) were in the range from 1.9 to 3.4% for Myoglobin (11.7 to 620.0 ng/ml), 3.8 to 5.8 % for CK-MB (4.7 to 412.3 ng/ml) and 3.3 to 5.3 % for Troponin I (0.8 to 90.9 ng/ml). Between-run imprecision (n=20) showed CVs in the range from 3.9 to 6.8 % (Myoglobin, 9,6 to 578,8 ng/ml), 4.1 to 9.1 % (CK-MB, 4.1 to 416.7 ng/ml) and 5.0 to 10.3 % (Troponin I, 0,8 to 93,4 ng/ml). Linearity was tested for troponin up to 91.0 ng/ml ($r = 0.9985$) myoglobin up to 640 ng/ml ($r = 0.9998$) and CK-MB up to 400 ng/ml ($r = 0.9999$). For all three assays no carry over was found with alternating very high and low concentrations (n=20). For method comparison (Passing/Bablok and Bland/Altman) patient samples (n=144) were analyzed for CK- MB and myoglobin at the IMMULITE 2500 and at the ADVIA Centaur (Bayer) and for Troponin I the IMMULITE Turbo assay was used additionally as third method. Data analysis showed good correlation for all methods with the best being between the new IMMULITE 2500 Troponin I and the IMMULITE Turbo Troponin I assay.

The good analytical performance shown here and the short time-to-first-result of 15 minutes will certainly improve especially the assessment of cardiac episodes in the emergency room.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der instabilen Angina pectoris nach Braunwald ^{35, 36} ...	17
Tabelle 2: Qualitätskontrollwerte für TnI IMMULITE 2500 in ng/ml (L5KSTI) ...	23
Tabelle 3: Qualitätskontrollwerte für CK-MB IMMULITE 2500 in ng/ml (L5KCP)	23
Tabelle 4: Qualitätskontrollwerte für Myoglobin IMMULITE 2500 in ng/ml (L5KMY)	23
Tabelle 5: Qualitätskontrollwerte für TnI Centaur in ng/ml.....	24
Tabelle 6: Qualitätskontrollwerte für CK-MB Centaur in ng/ml	24
Tabelle 7: Qualitätskontrollwerte für Myoglobin Centaur in ng/ml.....	24
Tabelle 8: Qualitätskontrollwerte für TnI IMMULITE Turbo	26
Tabelle 9: Verdünnungsreihe für Linearität von Troponin, CK-MB und Myoglobin am IMMULITE 2500	43
Tabelle 10: Ergebnisse der Inter- Präzision- Studie	47
Tabelle 11: Ergebnisse der Intra- Präzision- Studie	47
Tabelle 12: Ergebnisse der Verschleppung.....	49
Tabelle 13: Stabilitätsmessung (über Nacht bei Raumtemperaturen)	54
Tabelle 14: Stabilitätsmessung (über Nacht im Kühlschrank 6°C)	55
Tabelle 15: Inter- Assay- Präzisionsstudie	57
Tabelle 16: Intra-Assay- Präzision.....	57
Tabelle 18: Inter- Assay- Präzision	62
Tabelle 19: Intra- Assay- Präzision.....	62
Tabelle 20: Verschleppung CK- MB	64

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Troponin-Komplex aus Hirschl MM, Journal für Kardiologie 2006 ⁸⁸	10
Abbildung 2: Kurvenverlauf der Freisetzung der kardialen Biomarker ⁷	15
Abbildung 3: IMMULITE 2500	28
Abbildung 4: Bildung eines Sandwichkomplexes im IMMULITE 2500 ³⁰	29
Abbildung 5: Chemilumineszenz-Reaktion des IMMULITE 2500 ³⁰	31
Abbildung 6: ADVIA Centaur	33
Abbildung 7: Komplex aus PMP- Antikörper- Antigen- Antikörper- AE ²⁷	35
Abbildung 8: IMMULITE Turbo	39
Abbildung 9: 1. Verdünnungsreihe Troponin I	48
Abbildung 10: 2. Verdünnungsreihe Troponin I	48
Abbildung 11: Bablok- Passing Troponin I IMMULITE 2500 und IMMULITE Turbo	50
Abbildung 12: Bablok- Passin Troponin I IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur	51
Mit einer Regressionsgeradengleichung von $y = 1,3464 + 0,2114$ bedeutet das, dass der IMMULITE 2500 immer höher misst als der ADVIA Centaur.	51
Abbildung 13: Bland- Altman für Troponin I IMMULITE 2500 und IMMULITE Turbo	52
Abbildung 14: Bland- Altman für Troponin I IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur	53
Abbildung 15: Stabilität Troponin I relative Abweichung zu 100%	55
Abbildung 16: Stabilität Troponin I (über Nacht bei Raumtemperatur)	56
Abbildung 17: Stabilität Troponin I (über Nacht im Kühlschrank 6°C)	56
Abbildung 18: 1. Verdünnungsreihe von Myoglobin am IMMULITE 2500	58
Abbildung 19: 2. Verdünnungsreihe von Myoglobin am IMMULITE 2500	58
Abbildung 20: Bablok- Passing Myoglobin IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur	60
Abbildung 21: Bland- Altman für Myoglobin IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur	61
Abbildung 22: 1. Verdünnungsreihe von CK-MB am IMMULITE 2500	63
Abbildung 23: 2. Verdünnungsreihe von CK-MB am IMMULITE 2500	63
Abbildung 24: Bablok- Passing IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur	65

Abbildung 25: Bland- Altman für CK- MB am IMMULITE 2500 und ADVIA Centaur	66
Abbildung 26: Freisetzung der kardialen Enzyme nach AMI und Reperfusion ²	70

9 Abkürzungsverzeichnis

AACC	engl.: American Association for Clinical Chemistry
Abw.	Abweichung
ACC	engl.: American College of Cardiology
ACS	engl.: acute coronary syndrome
ACVB- OP	Aortencoronar-Venen- Bypass- Operation
AE	Acridiniumester
AG	Antigen
AK	Antikörper
AKS	Akutes koronares Syndrom
AMI	akuter Myokardinfarkt
AP	Angina pectoris
AST	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
B	(engl. brain) Gehirn
C	Celsius
Ca	Calcium
CABG	engl. coronary artery bypass graft
CK	Kreatinkinase
CK-MB	Kreatinkinase-MB
CPS	counts per second
cTnI	kardiales Troponin I
cTnT	kardiales Troponin T
Da	Dalton
DPC	Diagnostic Products Corp
durchschn.	durchschnittlich
EKG	Elektrokardiogramm
ESC	engl.: European Society of Cardiology
fTnI	(engl.: fast Troponin I) schnelles Troponin I
GOT	Glutaminaminotransferase
GPBB	Glycogen phosphorylase
ICD	implantierbarer Cardioverter/Defibrillator

IFCC	engl.: International Federation of clinical chemistry and laboratory medicine
kDa	kilo Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit
Konz.verhältnis	Konzentrationsverhältnis
LDH	Laktatdehydrogenase
LDI	engl.: logic driven Incubation
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	(engl.: muscle) Muskel
Mg	Magnesium
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MMD	engl.: minor myocardial damage
N	Anzahl
n.d.	nicht durchgeführt
neg.	negativ
ng	nanogramm
NIST	engl. National Institute of Standards and Technology
NSTEMI	nicht- ST- Streckenhebungsinfarkt
NTproANP	N-terminales pro-atriales natriuretisches Peptid
NTproBNP	N-terminales pro B-Typ Natriuretisches Peptid
OP	Operation
PCI	perkutane koronare Intervention
PMP	Paramagnetische Partikel
pos.	positiv
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
R	Korrelationskoeffizient
rCK- MB2	rekombinantes CK- MB2
rel.	relativ
RLU	engl. Relative Light Units
SD	Standardabweichung
STEMI	ST- Streckenhebungsinfarkt
sTnl	(engl.: slow Troponin I) langsames Troponin I

sTnT	skelettales Troponin T
TnC	Troponin C
TnI	Troponin I
WHO	(engl.: World Health Organization) Weltgesundheitsorganisation

10 Literaturverzeichnis

1. Bericht über die Todesursachen in Deutschland 2001.
www.statistischesbundesamt.de, 2001.
2. www.acc.org/qualityandscience/clinical/guidelines/STEMI/Guideline1/Images/figure11.jpg.
3. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000; 21(18):1502-13.
4. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. *Circulation* 1979; 59(3):607-9.
5. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial. Phase I findings. TIMI Study Group. *N Engl J Med* 1985; 312(14):932-6.
6. www.bipm.org/cc/JCTLM/Allowed/Dec.04_Symposium/JCTLM04-19.pdf.
7. www.med4you.at/laborbefunde/lbef2/lbef_troponin.htm.
8. Abendschein DR, Ellis, A.K., Eisenberg, P.R: et al. Prompt detection of coronary recanalization by analysis rates of change of concentrations of macromolecular markers in plasma. *Coron. Artery. Dis.* 1991; 2:201.
9. Adams JE, 3rd. Utility of cardiac troponins in patients with suspected cardiac trauma or after cardiac surgery. *Clin Lab Med* 1997; 17(4):613-23.
10. Adams JE, 3rd, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? *Circulation* 1993; 88(2):750-63.
11. Adams JE, 3rd, Bodor GS, Davila-Roman VG, et al. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993; 88(1):101-6.
12. Adams JE, 3rd, Davila-Roman VG, Bessey PQ, et al. Improved detection of cardiac contusion with cardiac troponin I. *Am Heart J* 1996; 131(2):308-12.
13. Al Suwaidi J, Reddan DN, Williams K, et al. Prognostic implications of abnormalities in renal function in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2002; 106(8):974-80.
14. Al-Hillawi E CD, Trayer IP, Cummins P. Phosphorylationspecific antibodies for human cardiac troponin I. 25th European muscle congress, 1996. pp. 06-15.
15. Alkan SS. Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(2):153-6.
16. Almog C, Isakov A, Ayalon D, et al. Serum myoglobin in detection of myocardial necrosis in patients with "coronary insufficiency". *Clin Cardiol* 1987; 10(5):347-9.
17. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(3):959-69.

18. Amit G, Gilutz H, Cafri C, et al. What have the new definition of acute myocardial infarction and the introduction of troponin measurement done to the coronary care unit? Impacts on admission rate, length of stay, case mix and mortality. *Cardiology* 2004; 102(3):171-6.
19. Amodio G, Antonelli G, Varraso L, et al. Clinical impact of the troponin 99th percentile cut-off and clinical utility of myoglobin measurement in the early management of chest pain patients admitted to the Emergency Cardiology Department. *Coron Artery Dis* 2007; 18(3):181-6.
20. Anderson PA, Malouf NN, Oakeley AE, et al. Troponin T isoform expression in humans. A comparison among normal and failing adult heart, fetal heart, and adult and fetal skeletal muscle. *Circ Res* 1991; 69(5):1226-33.
21. Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, et al. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1996; 335(18):1342-9.
22. Apple FA, Jesse R.L., Newby L.K., Wu A., Christenson, R.H. National Academy of Clinical Biochemistry and IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: Analytical Issues for Biochemical Markers of Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2007; 115:e352-e355.
23. Apple FS, Henry TD, Berger CR, Landt YA. Early monitoring of serum cardiac troponin I for assessment of coronary reperfusion following thrombolytic therapy. *Am J Clin Pathol* 1996; 105(1):6-10.
24. Apple FS, Quist HE, Doyle PJ, et al. Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations. *Clin Chem* 2003; 49(8):1331-6.
25. Aviles RJ, Askari AT, Lindahl B, et al. Troponin T levels in patients with acute coronary syndromes, with or without renal dysfunction. *N Engl J Med* 2002; 346(26):2047-52.
26. Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *Cmaj* 2005; 173(10):1191-202.
27. Bayer. Bedienungsanleitung des ADVIA Centaur.
28. Bessman SP, Carpenter CL. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* 1985; 54:831-62.
29. Bhayana V, Henderson AR. Biochemical markers of myocardial damage. *Clin Biochem* 1995; 28(1):1-29.
30. Biermann D. Assaychemie und Messtechnik.pdf.
31. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1(8476):307-10.
32. Bodor GS, Oakeley AE, Allen PD, et al. Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation* 1997; 96(5):1495-500.
33. Bodor GS, Porter S, Landt Y, Ladenson JH. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. *Clin Chem* 1992; 38(11):2203-14.
34. Boltwood MD, Taylor CB, Burke MB, et al. Anger report predicts coronary artery vasomotor response to mental stress in atherosclerotic segments. *Am J Cardiol* 1993; 72(18):1361-5.

35. Braunwald E. Unstable angina. A classification. *Circulation* 1989; 80(2):410-4.
36. Braunwald E. WHO Definition: Heart disease. 6 th ed, 2001.
37. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(3):970-1062.
38. Braunwald E, Antman, EM. Braunwald Heart Disease- A textbook of cardiovascular medicine. 5th ed: W.B. Saunders Company, 1997.
39. Brogan GX, Jr., Friedman S, McCuskey C, et al. Evaluierung of a new rapid quantitative immunoassay for serum myoglobin versus CK-MB for ruling out acute myocardial infarction in the emergency department. *Ann Emerg Med* 1994; 24(4):665-71.
40. Bucher EA, Maisonpierre PC, Konieczny SF, Emerson CP, Jr. Expression of the troponin complex genes: transcriptional coactivation during myoblast differentiation and independent control in heart and skeletal muscles. *Mol Cell Biol* 1988; 8(10):4134-42.
41. Buechler KF MPP. Novel methods for the assay of troponin I and T and complexes of troponin I and T and selection of antibodies for use in immunoassays. International Patent Application 1995; PCT/U S 96/05476.
42. Bundesamt. Statistiken für Deutschland in Wiesbaden. 2007.
43. Büttner HH, W; Trenk, D; Müller, C; Neumann, F-J. Neue Myokardinfarktdefinition der europäischen und amerikanischen kardiologischen Gesellschaften (ESC/ACC) und Langzeitprognose bei Patienten mit frühinvasiver Behandlung. Weltkongreß für Kardiologie, 2006.
44. Christenson RH. Troponin I measurement: evolution of a biomarker essential for assessment of myocardial injury. Presented at Symposium on Reference measurement systems for biologicals. Paris, December 2004 2004.
45. Christenson RH, Duh SH, Apple FS, et al. Standardization of cardiac troponin I assays: round Robin of ten candidate reference materials. *Clin Chem* 2001; 47(3):431-7.
46. Christenson RH, Ohman EM, Topol EJ, et al. Assessment of coronary reperfusion after thrombolysis with a model combining myoglobin, creatine kinase-MB, and clinical variables. TAMI-7 Study Group. Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction-7. *Circulation* 1997; 96(6):1776-82.
47. Christenson RH, Vaidya H, Landt Y, et al. Standardization of creatine kinase-MB (CK-MB) mass assays: the use of recombinant CK-MB as a reference material. *Clin Chem* 1999; 45(9):1414-23.
48. Coudrey L. The troponins. *Arch Intern Med* 1998; 158(11):1173-80.
49. Cummins B, Auckland ML, Cummins P. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1987; 113(6):1333-44.
50. Cummins B, Russell, GJ., Cummins P. A monoclonal antibody that distinguishes phosphorylated and dephosphorylated forms of cardiac troponin I. *Biochem Soc Trans* 1991; 19:S-161.

51. Dawson DM, Eppenberger HM, Kaplan NO. The comparative enzymology of creatine kinases. II. Physical and chemical properties. *J Biol Chem* 1967; 242(2):210-7.
52. Dengler TJ, Zimmermann R, Braun K, et al. Elevated serum concentrations of cardiac troponin T in acute allograft rejection after human heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32(2):405-12.
53. Dhoot GK, Gell PG, Perry SV. The localization of the different forms of troponin I in skeletal and cardiac muscle cells. *Exp Cell Res* 1978; 117(2):357-70.
54. Dhoot GK, Perry SV. Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. *Nature* 1979; 278(5706):714-8.
55. Dreyfus JC, Schapira G, Resnais J, Scebat L. [Serum creatine kinase in the diagnosis of myocardial infarct.]. *Rev Fr Etud Clin Biol* 1960; 5:386-7.
56. Dudley R. Chemiluminescence immunoassay: an alternative to RIA. *Lab Med* 1990; 21:216- 221.
57. Ebashi S, Endo M, Otsuki I. Control of muscle contraction. *Q Rev Biophys* 1969; 2(4):351-84.
58. Ebashi S, Kodama A, Ebashi F. Troponin. I. Preparation and physiological function. *J Biochem (Tokyo)* 1968; 64(4):465-77.
59. Ebashi S TY, Momoi H, Sugita H. High creatine phosphokinase activity of sera of progressive muscular dystrophy. *J Biochem* 1959; 46:103-106.
60. Eggers KM, Jaffe AS, Lind L, et al. Value of cardiac troponin I cutoff concentrations below the 99th percentile for clinical decision-making. *Clin Chem* 2009; 55(1):85-92.
61. Eppenberger HM. A brief summary of the history of the detection of creatine kinase isoenzymes. *Mol Cell Biochem* 1994; 133-134:9-11.
62. Eppenberger HM, Eppenberger M, Richterich R, Aepli H. The Ontogeny of Creatine Kinase Isozymes. *Dev Biol* 1964; 10:1-16.
63. Farah CS, Miyamoto CA, Ramos CH, et al. Structural and regulatory functions of the NH₂- and COOH-terminal regions of skeletal muscle troponin I. *J Biol Chem* 1994; 269(7):5230-40.
64. Farah CS, Reinach FC. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *Faseb J* 1995; 9(9):755-67.
65. Filatov VL, Katrukha AG, Bulargina TV, Gusev NB. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry (Mosc)* 1999; 64(9):969-85.
66. Galvani M, Ottani F, Ferrini D, et al. Prognostic influence of elevated values of cardiac troponin I in patients with unstable angina. *Circulation* 1997; 95(8):2053-9.
67. Galvani M, Panteghini M, Ottani F, et al. The new definition of myocardial infarction: analysis of the ESC/ACC Consensus Document and reflections on its applicability to the Italian Health System. *Ital Heart J* 2002; 3(9):543-57.
68. Ganz P, Abben RP, Barry WH. Dynamic variations in resistance of coronary arterial narrowings in angina pectoris at rest. *Am J Cardiol* 1987; 59(1):66-70.
69. Garcia de la Villa B. BD, Jurado A. The value of cardiac troponin I as diagnostic test in the study of chest pain. *Rev Esp Cardiol* 1998; 51:122-128.

70. Gasser R, Hauptlorenz S, Dworzak E, Moll W, Puschendorf B, Dienstl F. The typical staccato phenomenon of myoglobin in acute myocardial infarction disappears under thrombotic treatment. *Fibrinolysis* 1987; 1:177-182.
71. Gerhardt W, Katus H, Ravkilde J, et al. S-troponin T in suspected ischemic myocardial injury compared with mass and catalytic concentrations of S-creatine kinase isoenzyme MB. *Clin Chem* 1991; 37(8):1405-11.
72. Goldhaber SZ. Cardiac biomarkers in pulmonary embolism. *Chest* 2003; 123(6):1782-4.
73. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* 2000; 80(2):853-924.
74. Hafner G, T-KB, Schaube J., Kupferwasser J., Ehrental W., Cummins P. Cardiac troponins in serum in chronic renal failure [Letter]. *Clin Chem* 1994; 40:1790-1.
75. Hamm CW. Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom, Teil 1: ACS ohne persistierende ST-Hebung. *Z Kardiologie* 2004; 93:72-90.
76. Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation* 2000; 102(1):118-22.
77. Hamm CW, Goldmann BU, Heeschen C, et al. Emergency room triage of patients with acute chest pain by means of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I. *N Engl J Med* 1997; 337(23):1648-53.
78. Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, et al. The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. *N Engl J Med* 1992; 327(3):146-50.
79. Harrisons. Harrisons- Innere Medizin. 16th ed: AB Wissenschaftsverlag, 2005.
80. Hartner KT, Pette D. Fast and slow isoforms of troponin I and troponin C. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur J Biochem* 1990; 188(2):261-7.
81. Heeschen C, Hamm CW, Goldmann B, et al. Troponin concentrations for stratification of patients with acute coronary syndromes in relation to therapeutic efficacy of tirofiban. PRISM Study Investigators. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management. *Lancet* 1999; 354(9192):1757-62.
82. Henderson AR, Gerhardt W, Apple FS. The use of biochemical markers in ischaemic heart disease: summary of the roundtable and extrapolations. *Clin Chim Acta* 1998; 272(1):93-100.
83. Herder. Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1995.
84. Herzberg O, James MN. Refined crystal structure of troponin C from turkey skeletal muscle at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* 1988; 203(3):761-79.
85. Herzberg O, James MN. Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 Å resolution. *Nature* 1985; 313(6004):653-9.
86. Herzberg O, Moulton J, James MN. A model for the Ca²⁺-induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *J Biol Chem* 1986; 261(6):2638-44.
87. Hillis LD, Braunwald E. Coronary-artery spasm. *N Engl J Med* 1978; 299(13):695-702.
88. Hirschl MM. *Journal für Kardiologie* 2006; 13:301-305.

89. Hoberg E, Katus HA, Diederich KW, Kubler W. Myoglobin, creatine kinase-B isoenzyme, and myosin light chain release in patients with unstable angina pectoris. *Eur Heart J* 1987; 8(9):989-94.
90. Horacek JM, Tichy M, Jebavy L, et al. Use of multiple biomarkers for Evaluierung of anthracycline-induced cardiotoxicity in patients with acute myeloid leukemia. *Exp Oncol* 2008; 30(2):157-9.
91. Houdusse A, Love ML, Dominguez R, et al. Structures of four Ca²⁺-bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca²⁺-switch in the calmodulin superfamily. *Structure* 1997; 5(12):1695-711.
92. Ingraham RH, Swenson CA. Binary interactions of troponin subunits. *J Biol Chem* 1984; 259(15):9544-8.
93. Ingwall JS, Kramer MF, Fifer MA, et al. The creatine kinase system in normal and diseased human myocardium. *N Engl J Med* 1985; 313(17):1050-4.
94. Jacquet L, Noirhomme P, El Khoury G, et al. Cardiac troponin I as an early marker of myocardial damage after coronary bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998; 13(4):378-84.
95. Jaffe AS, Garfinkel BT, Ritter CS, Sobel BE. Plasma MB creatine kinase after vigorous exercise in professional athletes. *Am J Cardiol* 1984; 53(6):856-8.
96. Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, et al. It's time for a change to a troponin standard. *Circulation* 2000; 102(11):1216-20.
97. Jaffe AS, Ritter C, Meltzer V, et al. Unmasking artifactual increases in creatine kinase isoenzymes in patients with renal failure. *J Lab Clin Med* 1984; 104(2):193-202.
98. James S, Flodin M, Johnston N, et al. The antibody configurations of cardiac troponin I assays may determine their clinical performance. *Clin Chem* 2006; 52(5):832-7.
99. Jiang W, Hayano J, Coleman ER, et al. Relation of cardiovascular responses to mental stress and cardiac vagal activity in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1993; 72(7):551-4.
100. Katrukha A. Antibody selection strategies in cardiac troponin assay. 2nd ed. Totowa (NJ): Humana Press Inc., 2003.
101. Katrukha A SM, Bereznikova A, Esakova T, Gusev N, Pettersson K, Lovgren T. Phosphorylation of human cardiac troponin I by protein kinase A affects its immunological activity. *International Congress of Clinical Enzymology*. Cambridge, UK, 1996. pp. M12/P24.
102. Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, et al. Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection. *Clin Chem* 1998; 44(12):2433-40.
103. Katus HA, Looser S, Hallermayer K, et al. Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem* 1992; 38(3):386-93.
104. Katus HA, Remppis A, Looser S, et al. Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *J Mol Cell Cardiol* 1989; 21(12):1349-53.
105. Katus HA, Remppis A, Neumann FJ, et al. Diagnostic efficiency of troponin T measurements in acute myocardial infarction. *Circulation* 1991; 83(3):902-12.
106. Kaufmann A, Nassabi, C. Marketing Newsletter- Liason Troponin I- PProduct Launch. Firma Byk- Sangtex Diagnostika 2001.

107. Keshgegian AA, Feinberg NV. Serum creatine kinase MB isoenzyme in chronic muscle disease. *Clin Chem* 1984; 30(4):575-8.
108. Khuchua ZA, Ventura-Clapier R, Kuznetsov AV, et al. Alterations in the creatine kinase system in the myocardium of cardiomyopathic hamsters. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165(2):748-57.
109. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517):495-7.
110. Kwong TC, Fitzpatrick PG, Rothbard RL. Activities of some enzymes in serum after therapy with intracoronary streptokinase in acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1984; 30(5):731-4.
111. Kyle C. Troponins- Valuable New Cardiac Markers: Diagnostic Medlab, 2000.
112. Labarrere CA, Nelson DR, Cox CJ, et al. Cardiac-specific troponin I levels and risk of coronary artery disease and graft failure following heart transplantation. *Jama* 2000; 284(4):457-64.
113. Ladue JS, Wroblewski F, Karmen A. Serum glutamic oxaloacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarction. *Science* 1954; 120(3117):497-9.
114. Larue C, Calzolari C, Bertinchant JP, et al. Cardiac-specific immunoenzymometric assay of troponin I in the early phase of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 1993; 39(6):972-9.
115. Lauer B, Niederau C, Kuhl U, et al. [Cardiac troponin T in the diagnosis and follow up of suspected myocarditis]. *Dtsch Med Wochenschr* 1998; 123(14):409-17.
116. Le Moigne F, Beauvieux MC, Derache P, Darmon YM. Determination of myoglobin: comparative Evaluierung of the new automated VIDAS assay with two other immunoassays. *Clin Biochem* 2002; 35(4):255-62.
117. Leavis PC, Gergely J. Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *CRC Crit Rev Biochem* 1984; 16(3):235-305.
118. Lee TH, Rouan GW, Weisberg MC, et al. Sensitivity of routine clinical criteria for diagnosing myocardial infarction within 24 hours of hospitalization. *Ann Intern Med* 1987; 106(2):181-6.
119. Lehrer SS. The regulatory switch of the muscle thin filament: Ca²⁺ or myosin heads? *J Muscle Res Cell Motil* 1994; 15(3):232-6.
120. Lindahl B, Venge P, Wallentin L. Relation between troponin T and the risk of subsequent cardiac events in unstable coronary artery disease. The FRISC study group. *Circulation* 1996; 93(9):1651-7.
121. Loogna E, Sylven C, Groth T, Mogensen L. Complexity of enzyme release during acute myocardial infarction in a controlled study with early nifedipine treatment. *Eur Heart J* 1985; 6(2):114-9.
122. Mair J. Cardiac troponin I and troponin T: are enzymes still relevant as cardiac markers? *Clin Chim Acta* 1997; 257(1):99-115.
123. Mair J, Dienstl F, Puschendorf B. Cardiac troponin T in the diagnosis of myocardial injury. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1992; 29(1):31-57.
124. Mair J, Puschendorf B. Neue Laborparameter zur Diagnose und Überwachung akuter Myokardschäden. *DG Klinische Chemie* 1994; 25:1- 15.
125. Mc Laurin M.D. AFS, Voss E.M., Herzog C.A., Sharkey S.W. Cardiac troponin I, cardiac troponin T and creatine kinase MB in dialysis patients

- without ischemic heart disease: evidence of cardiac troponin T expression in skeletal muscle. *Clin Chem* 1997; 43:976-982.
126. McCord J, Nowak RM, Hudson MP, et al. The prognostic significance of serial myoglobin, troponin I, and creatine kinase-MB measurements in patients evaluated in the emergency department for acute coronary syndrome. *Ann Emerg Med* 2003; 42(3):343-50.
 127. Miettinen KH, Eriksson S, Magga J, et al. Clinical significance of troponin I efflux and troponin autoantibodies in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2008; 14(6):481-8.
 128. Missov E, Calzolari C, Davy JM, et al. Cardiac troponin I in patients with hematologic malignancies. *Coron Artery Dis* 1997; 8(8-9):537-41.
 129. Missov ED, De Marco T. Clinical insights on the use of highly sensitive cardiac troponin assays. *Clin Chim Acta* 1999; 284(2):175-85.
 130. Montague C, Kircher T. Myoglobin in the early Evaluierung of acute chest pain. *Am J Clin Pathol* 1995; 104(4):472-6.
 131. Mope L, McClellan GB, Winegrad S. Calcium sensitivity of the contractile system and phosphorylation of troponin in hyperpermeable cardiac cells. *J Gen Physiol* 1980; 75(3):271-82.
 132. Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, et al. Cardiac troponin T levels for risk stratification in acute myocardial ischemia. GUSTO IIA Investigators. *N Engl J Med* 1996; 335(18):1333-41.
 133. Ohman EM, Casey C, Bengtson JR, et al. Early detection of acute myocardial infarction: additional diagnostic information from serum concentrations of myoglobin in patients without ST elevation. *Br Heart J* 1990; 63(6):335-8.
 134. Panteghini M. Enzyme and muscle diseases. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7(6):469-74.
 135. Panteghini M. IFCC Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage: premises and project presentation. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36(11):887-93.
 136. Panteghini M. Standardization of cardiac troponin I measurements: the way forward? *Clin Chem* 2005; 51(9):1594-7.
 137. Panteghini M, Linsinger T, Wu AH, et al. Standardization of immunoassays for measurement of myoglobin in serum. Phase I: Evaluierung of candidate secondary reference materials. *Clin Chim Acta* 2004; 341(1-2):65-72.
 138. Parmecsek MS LJ. Structure, function, and regulation of troponin C. *Circ Res* 1991; 84:991-1003.
 139. Patel A, Morton, M.S., Woodhead, J.S., Ryall, M.E.T, Mc Capra, F., Campbell, A.K. A new chemiluminescent label for use in immunoassay. *Biochem Soc Trans* 1982; 10:224-225.
 140. Penttila IM, Laatikainen A, Penttila K, et al. Imprecision of cardiac marker analyses among laboratories on the basis of external quality assurance results: Finnish experience. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67(5):507-18.
 141. Perry SV. Troponin I: inhibitor or facilitator. *Mol Cell Biochem* 1999; 190(1-2):9-32.
 142. Ravkilde J, Horder M, Gerhardt W, et al. Diagnostic performance and prognostic value of serum troponin T in suspected acute myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest* 1993; 53(7):677-85.

143. Ravkilde J, Nissen H, Horder M, Thygesen K. Independent prognostic value of serum creatine kinase isoenzyme MB mass, cardiac troponin T and myosin light chain levels in suspected acute myocardial infarction. Analysis of 28 months of follow-up in 196 patients. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25(3):574-81.
144. Roberts R. Myoglobinemia as index to myocardial infarction. *Ann Intern Med* 1977; 87(6):788-9.
145. Roberts R, Sobel BE. Editorial: Isoenzymes of creatine phosphokinase and diagnosis of myocardial infarction. *Ann Intern Med* 1973; 79(5):741-3.
146. Robertson SP, Johnson JD, Holroyde MJ, et al. The effect of troponin I phosphorylation on the Ca^{2+} -binding properties of the Ca^{2+} -regulatory site of bovine cardiac troponin. *J Biol Chem* 1982; 257(1):260-3.
147. Saggin L, Gorza L, Ausoni S, Schiaffino S. Cardiac troponin T in developing, regenerating and denervated rat skeletal muscle. *Development* 1990; 110(2):547-54.
148. Saggin L, Gorza L, Ausoni S, Schiaffino S. Troponin I switching in the developing heart. *J Biol Chem* 1989; 264(27):16299-302.
149. Salomaa V, Koukkunen H, Ketonen M, et al. A new definition for myocardial infarction: what difference does it make? *Eur Heart J* 2005; 26(17):1719-25.
150. Savonitto S, Granger CB, Ardissino D, et al. The prognostic value of creatine kinase elevations extends across the whole spectrum of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(1):22-9.
151. Schuchert A, Hamm C, Scholz J, et al. Prehospital testing for troponin T in patients with suspected acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1999; 138(1 Pt 1):45-8.
152. Shi Q, Ling M, Zhang X, et al. Degradation of cardiac troponin I in serum complicates comparisons of cardiac troponin I assays. *Clin Chem* 1999; 45(7):1018-25.
153. Siegel AJ, Silverman LM, Evans WJ. Elevated skeletal muscle creatine kinase MB isoenzyme levels in marathon runners. *Jama* 1983; 250(20):2835-7.
154. Siegel RJ, Said JW, Shell WE, et al. Identification and localization of creatine kinase B and M in normal, ischemic and necrotic myocardium. An immunohistochemical study. *J Mol Cell Cardiol* 1984; 16(1):95-103.
155. Smith SC, Ladenson JH, Mason JW, Jaffe AS. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis. Experimental and clinical correlates. *Circulation* 1997; 95(1):163-8.
156. Solaro RJ, Moir AJ, Perry SV. Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline in the perfused rabbit heart. *Nature* 1976; 262(5569):615-7.
157. Squire JM, Morris EP. A new look at thin filament regulation in vertebrate skeletal muscle. *Faseb J* 1998; 12(10):761-71.
158. Strynadka NC, Cherney M, Sielecki AR, et al. Structural details of a calcium-induced molecular switch: X-ray crystallographic analysis of the calcium-saturated N-terminal domain of troponin C at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* 1997; 273(1):238-55.
159. Swaanenburg JC, Loeff BG, Volmer M, et al. Creatine kinase MB, troponin I, and troponin T release patterns after coronary artery bypass

- grafting with or without cardiopulmonary bypass and after aortic and mitral valve surgery. *Clin Chem* 2001; 47(3):584-7.
160. Syska H, Wilkinson JM, Grand RJ, Perry SV. The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. *Biochem J* 1976; 153(2):375-87.
161. Takeda S, Yamashita A, Maeda K, Maeda Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form. *Nature* 2003; 424(6944):35-41.
162. Talbot JA, Hodges RS. Synthetic studies on the inhibitory region of rabbit skeletal troponin I. Relationship of amino acid sequence to biological activity. *J Biol Chem* 1981; 256(6):2798-802.
163. Technology NloSa. Certificate of analysis. Standard reference material 2921: human cardiac troponin complex. Gaithersburg, MD: NIST 2004.
164. Thews M, Vaupel. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 6th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2007.
165. Thygesen K, Alpert JS, White HD, et al. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2007; 116(22):2634-53.
166. Tietz NW. *Fundamentals of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1987.
167. Toyota N, Shimada Y. Differentiation of troponin in cardiac and skeletal muscles in chicken embryos as studied by immunofluorescence microscopy. *J Cell Biol* 1981; 91(2 Pt 1):497-504.
168. Trask RV, Billadello JJ. Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1049(2):182-8.
169. Tsung JS, Tsung SS. Creatine kinase isoenzymes in extracts of various human skeletal muscles. *Clin Chem* 1986; 32(8):1568-70.
170. Vaidya H. Myoglobin: an early biochemical marker for the diagnosis of acute myocardial infarction. *J Clin Immunoassay* 1994; 17:35-39.
171. Vallins WJ, Brand NJ, Dabhade N, et al. Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction. *FEBS Lett* 1990; 270(1-2):57-61.
172. Vassilyev DG, Takeda S, Wakatsuki S, et al. Crystal structure of troponin C in complex with troponin I fragment at 2.3-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(9):4847-52.
173. Weeks I, Beheshti I, McCapra F, et al. Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassay. *Clin Chem* 1983; 29(8):1474-9.
174. Weeks I, Woodhead, J.S. Chemiluminescence immunoassay. *J. Clin Immunoassay* 1984; 7:82- 89.
175. Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1979; 25(9):1531-46.
176. Wilkinson JM, Grand RJ. Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature* 1978; 271(5640):31-5.
177. Winegrad S. Regulation of cardiac contractile proteins. Correlations between physiology and biochemistry. *Circ Res* 1984; 55(5):565-74.
178. Wong SS. Strategic utilization of cardiac markers for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann Clin Lab Sci* 1996; 26(4):301-12.
179. Wroblewski F, Ross C, Gregory K. Isoenzymes and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1960; 263:531-6.

180. Wu AH. Analytical and clinical Evaluierung of new diagnostic tests for myocardial damage. *Clin Chim Acta* 1998; 27:11-21.
181. Wu AH, Abbas SA, Green S, et al. Prognostic value of cardiac troponin T in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1995; 76(12):970-2.
182. Yamashita T, Abe S, Arima S, et al. Myocardial infarct size can be estimated from serial plasma myoglobin measurements within 4 hours of reperfusion. *Circulation* 1993; 87(6):1840-9.
183. Zabel M, Hohnloser SH, Koster W, et al. Analysis of creatine kinase, CK-MB, myoglobin, and troponin T time-activity curves for early assessment of coronary artery reperfusion after intravenous thrombolysis. *Circulation* 1993; 87(5):1542-50.
184. Zimmerman J, Fromm R, Meyer D, et al. Diagnostic marker cooperative study for the diagnosis of myocardial infarction. *Circulation* 1999; 99(13):1671-7.
185. Zot AS, Potter JD. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1987; 16:535-59.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Albert, Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Behr, Berger, Bien, Büch, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Dünne, Dominguez, Duda, Eberhart, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feiber, Fuchs, Garten, Geks, Gemsa, Gerdes, Geus, Görg, Griss, Grzeschik, Grimm, Groß, Gudermann, Hadji, Hamer, Happle, Hartmann, Hasilik, Hertl, Hofbauer, Hofmann, Hörle, Hoyer, Ihm, Jacob, Jaques, Jones, Jungclas, Kalder, Kann, Kanngiesser, Kill, Kim-Berger, Klaus, Kleine, Klenk, Klose, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Kühnert, Lang, Langer, Lemke, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Mann, Martin, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Müller, Mutters, Neubauer, Netter, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Peter, Quante, Rehder, Reinartz, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rose, Rosenow, Rothmund, Rucholtz, Rupp, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schmitt, Schmitz, Schnabel, Schneider, Schultz, Schunck, Seitz, Sommer, Steiniger, Stiewe, Stiletto, Strempel, Studer, Sure, Tebbe, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Wahl, Waldegger, Weihe, Werner, Wiegandt, Wulf

Meine akademischen Lehrer in Winterthur (Schweiz) waren die Damen und Herren:

Berghorn, Hess, Prentl

Meine akademischen Lehrer in Berlin waren die Damen und Herren:

Bauknecht, Kienapfel, Lackner, Polak, Rhode, Schühlen, Spierer, Voss

DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. Dr. Wahl danke ich für die Vergabe des Themas, die Unterstützung und Betreuung der Arbeit während ihrer gesamten Entstehung.

Herrn Prof. Dr. Renz danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Mitarbeiter des Zentrallaboratoriums der Universitätsklinik Marburg, insbesondere Frau Scheckel und Frau Schneider. Durch ihre unkomplizierte und freundliche Art haben sie das Arbeiten im Labor sehr angenehm gemacht. Alle waren stets sehr hilfsbereit und geduldig. Das Zusammenarbeiten hat viel Spaß gemacht.

Einen persönlichen Dank möchte ich Britta Zerbian und Maria Sommer aussprechen, mit denen ich viele Tage und manchmal auch Nächte im Labor verbracht habe. Meinen Freunden, die mir mit Rat und Tat bei der Erstellung der Abbildungen und bei der Einführung in die Formatierung sehr geholfen haben, danke ich für die Geduld und die Unterstützung.

Meiner Familie und Frank Schulte danke ich für den Beistand, die Förderung meiner Motivation und die Unterstützung in allen Lebenslagen.